



REPÚBLICA DE CUBA

REC'D 09 JUL 2001

WIPO PCT



Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número trescientos seis del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por CÁMARA DE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE, ACCESORIOS Y MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN RÁPIDA Y REPRODUCIBLE DE GRANDES MOLÉCULAS DE ADN, con fecha veintisiete de diciembre de dos mil, a las nueve horas y cincuenta minutos ante meridiano, por Violeta María Herrera Cabrera, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CNIC), cuya invención fue creada por Ana María Riverón Rojas; Lilia López Cánovas; Oscar Arencibia Díaz; José Alfredo Herrera Isidró; Esther Orozco Orozco; Gabriel Pérez Pérez; Carlos Alberto Canino Ramos; Luis Mariano Batista Santiler; Regnar Gigato Pérez; María Dolores Noa Blanco y Elisa Javert Higginson.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

ASIMISMO CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Violeta María Herrera Cabrera, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los trece días del mes de junio dos mil uno.

Lic. América N. Santos Riveras
Directora General

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN

CÁMARA DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

DESCRIPCION

5

TÍTULO DE LA INVENCION: CÁMARAS DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODOS PARA LA SEPARACIÓN DE GRANDES MOLÉCULAS DE ADN.

10

ÍNDICE DE LA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES: G01N 27/26.

15

CAMPO O RAMA DE LA TÉCNICA CON LA QUE SE RELACIONA LA INVENCION:

La presente invención se relaciona con las ramas de la biología molecular, genética, microbiología, parasitología y biotecnología en general. En específico, con la separación de grandes moléculas de ADN mediante el empleo de electroforesis de campos pulsantes (ECP) en mini-equipos y geles. Las cámaras, accesorios y métodos poseen aplicaciones en la tipificación de ceparios biotecnológicos de la industria alimenticia, de ceparios de laboratorios de investigaciones, de ceparios de laboratorios clínicos microbiológicos. También posee aplicaciones en la epidemiología molecular de enfermedades infecciosas y en la epidemiología y origen de las contaminaciones en la industria biotecnológica. Puede ser empleada en la tipificación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, en la caracterización del genoma de especies vegetales, de mamíferos y del hombre y en el estudio de enfermedades hereditarias. En todas esas aplicaciones pueden desarrollarse nuevos métodos rápidos y reproducibles para su control y diagnóstico.

25

NIVEL CONOCIDO DE LA TÉCNICA. CARACTERÍSTICAS DE LAS SOLUCIONES TÉCNICAS ANÁLOGAS.

30

1.-La electroforesis de campos pulsantes

La electroforesis de campos pulsantes (ECP) data de 1984, cuando Schwartz D.C. y Cantor C. (Cell, 37, 67-75, 1984; Patente U.S. No. 4,473,452) observaron que las

grandes moléculas intactas de ADN se resolvían en los geles de agarosa en patrones de bandas mediante la aplicación de pulsos eléctricos que alternaban periódicamente su dirección de aplicación, la que formaba un cierto ángulo en relación con el gel. Los autores también determinaron que la separación de las moléculas dependía esencialmente de la duración de los pulsos eléctricos. Con posterioridad, se determinó que la geometría de las líneas de fuerza de los campos eléctricos alternantes, la intensidad de los mismos, la temperatura experimental, la fuerza iónica de la solución tampón y la concentración del gel de agarosa eran factores importantes que influían en la resolución que podía ser alcanzada entre las moléculas de ADN (Birren B. y Lai E. Academic Press. New York, 1993, pp 107, 111, 129, 131, 135; López-Cánovas L. y cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139; López-Cánovas L. y cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197).

La electroforesis de campos pulsantes brinda las separaciones de las moléculas de ADN en forma de patrones de bandas. Es decir cada patrón se forma después de la electroforesis en las carrileras de los geles de separación. A su vez, en cada pocillo del gel se depositan bloques de agarosa que contienen las moléculas inmovilizadas de ADN, las que durante la electroforesis migran a lo largo de dichas carrileras y forman los patrones de bandas. Por tanto, este tipo de electroforesis tiene asociado un método para preparar moléculas de ADN intactas e inmovilizadas en bloques de gel. Esas moléculas pueden ser, o no, digeridas con endonucleasas de restricción antes de sufrir el proceso de electroforesis.

Se han desarrollado varios sistemas para realizar la ECP, los que se caracterizan por poseer cámaras en las cuales se colocan los electrodos en ordenamientos diferentes. Entre esas cámaras se encuentran las cámaras con ordenamiento de electrodos OFAGE (del Inglés, 'Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, Carle C.F. y Olson M.V. Nucleic Acids Res. 1984, 12, 5647-5664), CHEF ('Contour Clamped Homogeneous Electric Field', Chu G. Science 234, 1986, 1582-1585), TAFE ('Transversal Alternating Field Electrophoresis', Patente US. No. 4, 740, 283), FIGE ('Field Inversion Gel Electrophoresis', Patente US. No. 4, 737, 251 de Carle G.F. y Olson M.V) y las mini-cámaras MiniTAFE y MiniCHEF (Riverón, A.M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49). Todos esos sistemas se caracterizan por poseer circuitos electrónicos para

alternar los campos eléctricos y por poseer accesorios para preparar el gel. También existen accesorios para preparar las muestras.

Los sistemas que se han desarrollado para realizar la ECP se diferencian entre sí por su capacidad, o incapacidad, de brindar trayectorias rectas de migración en los patrones de bandas. Esa capacidad es esencial cuando se desean comparar los patrones que brindan numerosas muestras. De los sistemas mencionados, existen tres que brindan trayectorias rectas de migración de las moléculas.

10 1-EI sistema CHEF, que emplea un arreglo hexagonal de electrodos donde se fijan los potenciales eléctricos en un contorno cerrado alrededor de un gel submarino colocado horizontalmente.

2-EI sistema TAFE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos que se colocan verticales en la cámara y emplea campos alternantes transversales en relación con el gel.

15 3-EI sistema FIGE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos horizontales que se colocan en cámaras convencionales de electroforesis, las que poseen dos electrodos donde se revierte periódicamente la orientación del campo eléctrico.

20 Aunque las cámaras FIGE son las más simples, pues son cámaras para realizar electroforesis convencional, en ellas se observan fenómenos de inversión de la movilidad de las moléculas. Esa inversión limita su utilización cuando se requiere analizar el tamaño de las moléculas de ADN que fueron separadas en las diferentes carrileras del gel o en varios experimentos. Por esa razón, los sistemas más utilizados en la actualidad para comparar los patrones de bandas de múltiples muestras son el CHEF y el TAFE.

El sistema TAFE fue propuesto por Gardiner K. y cols. en su publicación en **Somatic Cell Mol. Genet.** 1986, 12, 185-195, lo denominaron inicialmente como "Vertical Pulsed Field Electrophoresis" (VPFE) y desarrollaron un aparato que fue protegido por la **Patente U.S. No. 4, 740, 283** de abril 26 de 1988. Ese sistema de separación de moléculas de ADN consiste en colocar verticalmente un gel de 10 x 7,6 x 0,6 cm

(longitud x ancho x espesor) y disponer todos los electrodos paralelamente con las caras del gel y a todo lo ancho del mismo y de la cámara. En la cámara cada miembro de un par de electrodos de polaridades opuestas se coloca frente a una de las caras del gel. El cátodo se colocó en la parte superior y cercano al origen de migración y el ánodo alejado de este, al final del gel. Esta disposición de electrodos genera líneas isopotenciales a todo lo ancho del gel y un gradiente de potencial o campo eléctrico, donde las líneas de fuerza de dicho campo eléctrico atraviesan transversalmente al gel. Entonces, a lo largo del gel se obtiene un gradiente de intensidad de campo eléctrico y del ángulo que forman las líneas de fuerza de los dos pares de electrodos. Por esa razón, las moléculas son forzadas a migrar durante cada pulso a través del grosor del gel. La migración resultante ocurre en dirección vertical, hacia abajo. A pesar de la existencia de esos gradientes de intensidad del campo eléctrico, todos los puntos que se ubican a lo ancho del gel y a una misma altura con relación al plano que contiene ambos cátodos o ambos ánodos están a un mismo valor de potencial eléctrico (líneas isopotenciales). Por lo que las moléculas de igual tamaño recorren distancias similares durante la electroforesis en todas las carrileras del gel y migran siguiendo trayectorias rectas hasta la misma altura en el gel, con independencia del pocillo en el cual fueron depositadas las muestras.

Basado en esos principios, la Beckman Instrument, Inc. (**Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spingo Division of Beckman Instruments, 1988**) construyó el equipo denominado "Geneline I, o Transverse Alternating Field Electrophoresis System" conocido como TAFE. Este sistema emplea un gel de 11 x 7,2 x 0,6 cm (longitud x ancho x espesor), que se coloca entre pares de electrodos opuestos que están separados 20 cm. Con posterioridad, la Beckman Instrument, Inc. desarrolló el Equipo Geneline II en el cual el gel se agrandó hasta 14,2 x 15 x 0,3 cm. El equipo Geneline II está descontinuado en la actualidad.

El sistema CHEF fue desarrollado por Gilbert Chu (**Science 1986, 234, 16, 1582-1585**) con el siguiente fundamento: un campo eléctrico homogéneo es generado teóricamente por dos electrodos infinitos colocados paralelamente a cierta distancia. Para simular un campo homogéneo con electrodos finitos, otro grupo de electrodos se colocan en el mismo plano, a lo largo de un polígono cerrado, ya sea un cuadrado o un hexágono. Se

hace coincidir el eje X ($y=0$) del plano con un lado del polígono y se le aplica un potencial de 0 Volt. El lado opuesto, a una distancia $y=A$ del origen de coordenadas, se polariza a un potencial V_0 . El resto de los electrodos se polarizan según $V(y) = V_0 \cdot y/A$. De esta forma el potencial generado en el interior del polígono es igual al que sería
 5 generado por dos electrodos infinitos paralelos separados a una distancia A. El ángulo de reorientación obtenido al permutar electrónicamente la polaridad entre dos pares de lados diferentes será de 90° para el polígono cuadrado y de 60° o 120° para el hexagonal. Un método para fijar los potenciales deseados en los electrodos del CHEF es disponer de una serie de resistencias alambradas en forma de divisor de voltaje
 10 entre los potenciales $V(0) = 0$ y $V(A) = V_0$. De cada uno de los nodos, formados por la unión de dos resistencias, se obtiene el voltaje para polarizar un electrodo.

Basado en esos principios la firma BIORAD desarrolló los equipos CHEF-DR II, CHEF-DR III y CHEF Mapper (**Patente US. 4, 878, 008, Patente US. No. 5, 084, 157 y Patente US. 5, 549, 796**). Este último es el sistema más avanzado. Para la imposición
 15 de los valores de voltaje en el arreglo hexagonal de electrodos emplea un divisor de voltaje, alambrado a un sistema transistorizado y amplificadores operacionales. Esa electrónica garantiza que los valores que se fijan en cada electrodo del arreglo hexagonal de la cámara sean siempre correctos.

Las dimensiones de la cámara de electroforesis del CHEF Mapper son 11,4 x 44,2 x
 20 50,3 cm (alto x ancho x profundidad), pesa 10,2 Kg y utiliza 2,2 litros de solución tampón. Este sistema emplea un gel de 14 x 13 cm (ancho y longitud) que se coloca concéntrico con el arreglo hexagonal de 24 electrodos cuyos lados paralelos están separados a 30 cm o más. El CHEF Mapper también es capaz de emplear un gel más ancho en el cual pueden depositarse hasta 40 muestras.

25

Desventajas de las cámaras grandes de ECP.

Sin dudas podemos afirmar que los equipos TAFE y CHEF mencionados son capaces de separar electroforéticamente moléculas de ADN de talla cromosómica. Sin embargo,
 30 una desventaja común de los equipos CHEF y TAFE es que las cámaras son innecesariamente grandes y los geles innecesariamente largos, pues las dimensiones no han sido optimizadas, en particular cuando se emplean bloques delgados de

muestras. Ha sido demostrado que el grosor de los bloques de agarosa que contienen las muestras de ADN influye en la resolución de las bandas, en el tiempo de electroforesis y en última instancia, determina el largo del gel que se utilice (López-Cánovas L. y cols. *J Chromatogr. A*, 1998, 806, 187-197). En ese trabajo se demostró que si se desea obtener una resolución 'x' entre dos moléculas cualesquiera, ese valor se logra en menos espacio y menos tiempo si las bandas son delgadas o finas, lo cual se logra si los bloques son delgados también. Entre las consecuencias de emplear cámaras electroforéticas grandes están las siguientes:

- I) Cuando se desean aplicar campos eléctricos elevados se requiere emplear fuentes de poder con elevada salida de potencia máxima. Esas cámaras poseen más de 20 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas, por eso, el campo eléctrico máximo que puede aplicarse en dichos equipos está alrededor de 10 V/cm.
- II) Los experimentos son lentos en esas cámaras. Dos factores influyen: se emplean campos eléctricos muy bajos (alrededor de 6 V/cm como norma) y muestras gruesas de más 0,1 cm de grosor. Por ejemplo, un experimento normal consume 24 horas para obtener un patrón electroforético de once bandas cromosomales correspondientes a moléculas de ADN menores de 1,6 mega bases (10^6 pares de bases) de *Saccharomyces cerevisiae* y hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma de *Entamoeba histolytica* (Orozco E et al, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993, 59, 29-40).
- III) Los equipos no son económicos, pues utilizan grandes cantidades de reactivos costosos (tales como el Tris y la agarosa) y de muestra biológica. Esto último puede resultar prohibitivo para ciertas aplicaciones (por ejemplo en el diagnóstico clínico).
- IV) Se genera gran cantidad de calor en la cámara de electroforesis cuando se aumenta la fuerza motriz de la electroforesis o campo eléctrico (la misma depende del voltaje aplicado en los electrodos y de la intensidad de corriente que pasa por la solución tampón). Si se desea aumentar el campo eléctrico (en aras de aumentar la velocidad de separación), tiene que hacerse a expensas de aumentar la diferencia de potencial en los electrodos y por ende la intensidad de corriente. Por efecto Joule se aumentaría la generación de calor en la cámara de

electroforesis. Un aumento excesivo de la cantidad de calor ensancha y hace más difusas las bandas y provoca distorsión del patrón electroforético llegando incluso al atrapamiento de las moléculas de ADN en los poros del gel y a una ausencia completa de migración.

5

No obstante, el gran volumen de solución tampón que emplean estas cámaras tiene la ventaja que permite amortiguar cualquier turbulencia que se forme en la solución al ser recirculada. De igual forma el gel queda tan separado de los electrodos que cualquier cambio local de conductividad en las cercanías de los electrodos, producto de la electrólisis se diluye y casi es imperceptible por el gran volumen de solución.

10

Los mini-equipos de ECP

En 1995 se dieron a conocer los equipos MiniCHEF y MiniTAFE (Riverón A.M. y cols., **Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**) donde se realiza electroforesis de campos pulsantes a 8 muestras depositadas en un gel. Estos equipos superaron las deficiencias de los sistemas anteriormente mencionados. Tanto el MiniCHEF como el MiniTAFE emplean muestras delgadas de menos de 0,1 cm de grosor y permiten aplicar campos eléctricos más intensos brindando en los geles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético. Así, ellos permitieron resolver entre 4 y 5 horas los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

15

20

La separación entre sus electrodos opuestos es menor, lo que permite construir cámaras más pequeñas y emplear menos volumen de buffer para cubrir los electrodos y el gel (Riverón A.M. y cols., **Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**). Por eso, en los MiniCHEF y MiniTAFE se genera poco calor aun con campos eléctricos elevados. Las muestras depositadas en los geles de estos equipos emplean además poco material biológico (López-Cánovas L. y cols., **J Chromatogr A, 1998, 806, 187-197**). Ellos además ocupan poco espacio de laboratorio.

25

30

Los autores de estos equipos demostraron que la ECP puede realizarse en geles que no tienen que ser extremadamente largos. Por ejemplo, de 4 cm de longitud. Mediante

el empleo de mini-equipos, López-Cánovas L. y cols demostraron que bloques de más de 0,1 cm de grosor provocan la aparición de bandas gruesas que necesitan más tiempo y más longitud del gel para separarse. Sin embargo, el empleo de muestras gruesas no mejora en calidad el patrón electroforético, ni revela mayor cantidad de bandas.

Desventajas de los mini-equipos MiniCHEF y MiniTAFE

Los mini-equipos propuestos por Riverón A.M. y cols. para realizar electroforesis de campos pulsantes poseen cámaras cuyos tamaños se calculan sobre la base de la existencia de otros equipos de dimensiones mayores (**Riverón A.M. y cols, Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**). Por tanto, pueden heredar defectos de los equipos a partir de los cuales ellos son diseñados. De hecho, los mini-equipos heredaron de las cámaras grandes un sistema abierto para preparar el gel y la ausencia de un sistema limitador de turbulencias.

De hecho, en la patente y los artículos relacionados no se mencionan los efectos que produce la reducción de los volúmenes del tampón ni del gel sobre el patrón electroforético. Es decir, si esos volúmenes de tampón son suficientes para amortiguar las turbulencias del tampón durante la recirculación, ni si las irregularidades en el gel y las diferencias en las dimensiones de los bloques influyen en la calidad del patrón de bandas que se obtienen. Esos aspectos no son ni mencionados ni solucionados en esos trabajos. Los efectos dañinos mencionados aumentan con la miniaturización, pues esta tiene asociado un efecto de magnificación de los errores de manufactura. Por ejemplo, si se formara un menisco de 0,1 cm de altura de un gel de 1 cm de espesor el error en la altura del gel sería de 10%, mientras que ese mismo error en un gel de 0,4 cm de espesor representa el 25%. Por tanto, la magnificación de los errores al miniaturizar el sistema puede convertirse en un factor crítico para obtener patrones de bandas reproducibles.

Resumen de las desventajas de los equipos de ECP actuales.

No cabe duda que la magnitud crítica de los equipos de electroforesis de campos pulsantes es la distancia entre electrodos, pues ella determina los valores de campo eléctrico que pueden emplearse, o sea la fuerza motriz de las moléculas, las dimensiones de las cámaras, los sistemas que deben emplearse para homogeneizar las variables de la electroforesis, el ancho del gel de separación, el grosor de los bloques donde se incluirán las muestras y el ancho de cada muestra.

Si la separación entre los electrodos de polaridades opuestas no es óptima, por ejemplo, que sea demasiado grande, asimismo serán poco óptimas las dimensiones del gel, de la cámara y la cantidad de muestras que pueda depositarse en esos geles.

Si los bloques no son del grosor y tamaño apropiados, se puede desperdiciar gel y consumir mucho tiempo de electroforesis. Por tanto, el objetivo deseable es disponer de cámaras que posean dimensiones óptimas, que permitan aplicar campos eléctricos elevados y reducir las duraciones de las electroforesis sin perder resolución ni la alta capacidad de análisis de muestras.

De los razonamientos anteriores puede concluirse que:

I) Las cubetas grandes de los sistemas actuales de ECP no son óptimas, por cuanto las distancias entre electrodos de polaridades opuesta son innecesariamente grandes.

II) Los mini-equipos reportados anteriormente tampoco son óptimos, pues no contemplan los aspectos necesarios para amortiguar oscilaciones en la solución tampón ni preparar geles sin irregularidades, ni bloques delgados de tamaños similares en todas sus dimensiones.

Análisis de los factores que afectan la obtención de patrones de bandas reproducibles en las cámaras actuales de electroforesis de campos pulsantes.

Hasta el presente, se le ha prestado atención especial a lograr que los valores de voltaje con que se energizan los electrodos de las cubetas se mantengan sin variaciones durante el proceso de electroforesis. Esto es particularmente notorio en las cubetas de tipo CHEF, donde se requiere imponer valores dados de voltajes en cada electrodo del arreglo hexagonal. Sin embargo, no solo las variaciones en los valores de

voltaje afectan la calidad de los patrones de bandas y la reproducibilidad de los experimentos. La reproducibilidad de los patrones de bandas también se afecta por los factores que modifican la homogeneidad de los valores de corriente eléctrica en la cámara y los factores que pueden distorsionar la forma de las líneas de fuerza del campo eléctrico.

Esos otros factores no han sido considerados en su totalidad en los sistemas de ECP. Por eso, los sistemas actuales pueden provocar distorsión del patrón de bandas. Esos problemas son especialmente críticos en mini-equipos que emplean geles. Ellos son:

- I) Las cámaras no poseen aditamentos simples para evitar turbulencias en la solución tampón durante la recirculación del mismo entre la cámara y un intercambiador externo de calor.
- II) Los accesorios de preparar el gel de separación no contemplan aditamentos que impidan imperfecciones e irregularidades en el gel donde se realiza la electroforesis.
- III) Los accesorios para preparar las muestras incluidas en bloques de agarosa no contemplan que los bloques y pocillos deben tener dimensiones similares. Además, no existen aditamentos para lograr buen alineamiento de las muestras en el origen de migración.
- IV) No existen aditamentos en las cámaras mediante los cuales se garantice que se mantenga el grado de tensión de los electrodos.

Los aspectos mencionados afectan la obtención de patrones de bandas rectos y la reproducibilidad del patrón en las diferentes carrileras de un gel. En mayor grado afectan la reproducibilidad de los patrones de bandas en diferentes corridas electroforéticas con un mismo equipo u otro equipo.

i) El patrón electroforético, las turbulencias y la falta de homogeneidad de la conductividad y la temperatura del tampón en la cámara.

Las cámaras de electroforesis de campos pulsantes se llenan con una solución tampón y esta se recircula entre ella y un intercambiador externo de calor. Esta solución es el medio a través del cual se establece el campo eléctrico o fuera motriz a partir de los

potenciales que se aplican en los electrodos. Los procesos físico-químicos que ocurren en la solución durante la electroforesis: electrólisis, calentamiento por efecto Joule y variaciones de la concentración del tampón provocan inhomogeneidades a través del volumen de la solución. La temperatura, concentración y otras variables afectan la viscosidad de la solución y el campo eléctrico que en ella se establece, afectando así la movilidad de las moléculas de ADN de forma diferente a través de toda la cámara, cuando alguno de ellos varía incontroladamente. La electrólisis también afecta la conductividad del tampón. La solución que se encuentra en la cámara se intercambia constantemente con otro volumen termostatado a una temperatura fija. Esto se realiza con ayuda de una bomba peristáltica. De esa manera, se intenta que las características de la solución tampón se mantengan homogéneas y constantes durante toda la electroforesis.

El flujo con que se intercambia la solución debe garantizar el recambio total de todo el volumen contenido en la cámara en pocos minutos. Sin embargo al inyectar la solución a cierta velocidad en la cámara se producen turbulencias que provocan inhomogeneidades locales en el campo eléctrico aplicado, las que afectan también la movilidad de las moléculas de ADN que se están separando.

El patrón de bandas resultante es dependiente de cambios en la conductividad de la solución tampón de la cámara y de la presencia de turbulencias en dicha solución. Esas turbulencias se acentúan cuando se recircula el tampón a alto flujo. Las turbulencias, remolinos u olas varían localmente la altura de dicha solución, modificando aleatoriamente y regionalmente los valores de resistencia eléctrica. Las diferencias de la corriente que circula entre distintas regiones de la cámara modifican la migración de las moléculas de ADN y puede generar patrones de bandas distorsionados.

El equipo CHEF MAPPER de la firma BIORAD contempla en cierta medida este problema (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4. Bio-Rad**). La cámara de electroforesis CHEF posee dos cámaras pequeñas situadas bajo la cámara principal una al frente y otra

detrás. Estas pequeñas cámaras se utilizan para recircular la solución tampón. La solución entra a la cámara principal a través de seis huecos horadados en el piso cerca del borde. Un deflector de flujo colocado frente a los huecos evita el movimiento del gel. Este sistema sin embargo no es muy eficiente para evitar la formación de turbulencias en la solución, en especial cuando se emplea un flujo alto.

Ni el TAFE, ni los mini-equipos poseen ningún sistema que limite las turbulencias que pueden crearse en la solución tampón al recircular, lo cual es una desventaja. Es fácil intuir que la influencia dañina de las turbulencias se manifiesta más en cámaras pequeñas que llevan menos volumen de tampón. Por ejemplo, en la cámara del CHEF Mapper, que se llena con 2,2 L de solución tampón, esas turbulencias se amortiguan más fácil que en las minicámaras MiniCHEF y MiniTAFE que utilizan casi 10 veces menos volumen.

Como se mencionó, las cámaras grandes de ECP amortiguan en cierta medida las oscilaciones en el tampón. Sin embargo, los mini-equipos de ECP son relativamente recientes, quizás por eso no se ha brindado atención especial al desarrollo de sistemas amortiguadores de turbulencias del tampón.

II) El patrón electroforético y las irregularidades en la superficie del gel de separación.

Los geles que utilizan los equipos CHEF y TAFE de dimensiones grandes así como el de los mini-equipos, se preparan en un molde de las dimensiones del gel, donde se coloca un peine y se vierte la agarosa fundida. Después se espera que la agarosa solidifique con el molde destapado. Sin embargo, debido a la tensión superficial de la agarosa líquida, esta sube por las paredes del recipiente donde se prepara el gel y forma meniscos. Esos meniscos se forman entre los pocillos donde se depositarán las muestras posteriormente o en las paredes del recipiente que se emplea para solidificar el gel. El molde para preparar el gel del TAFE posee una tapa, pero no posee aditamentos que eviten la formación de meniscos entre los dientes del peine. Los geles del CHEF y de los MiniCHEF y MiniTAFE no poseen tapa, por tanto en ellos se forman meniscos en los lugares anteriormente mencionados.

El gel es el medio en el cual ocurre la migración de las moléculas de ADN durante la electroforesis de campos pulsantes. La presencia de meniscos en los bordes laterales del gel, o entre los pocillos, modifica en esas regiones la resistencia eléctrica en el gel y por tanto la corriente eléctrica. Los cambios regionales de corriente en el gel afectan la migración de las moléculas de ADN en dichas regiones. Esos cambios son importantes cuando se forman meniscos entre los pocillos donde se depositarán las muestras. Los pocillos son el origen de migración de las moléculas, por tanto, si esas irregularidades introducen cambios en las velocidades de migración de las moléculas, el frente de migración de las moléculas se originará distorsionado. Entonces esa distorsión se mantendrá durante todo el proceso de electroforesis, obteniéndose al final un patrón distorsionado en esa carrilera del gel. Cualquier irregularidad del gel en otra región también afectará la migración de las moléculas que atraviesan dicha región.

Desde el punto de vista de reproducibilidad de los patrones de bandas, los accesorios que se emplean para preparar el gel y la manera de emplearlos es por lo tanto importante. El diseño de sistemas eficientes para electroforesis de campos pulsantes se ha centrado fundamentalmente en brindar cámaras con diferentes configuraciones de electrodos y en brindar una electrónica adecuada para alternar los campos e imponer los voltajes. No se ha brindado atención especial a las propiedades de los accesorios para solidificar el gel.

III) El patrón electroforético, el tamaño de los bloques que contienen las muestras y su mal alineamiento en el origen de migración.

Como se mencionó, la electroforesis de campos pulsantes tiene asociada la metodología de preparación de moléculas intactas e inmovilizadas de ADN en bloques de gel. Cuando se desean preparar muestras de ADN inmovilizado es necesario disponer de moldes para la formación de las mismas. Los moldes existentes son los siguientes:

- a) los que forman bloques similares e independientes (**Cantor C.R. y Schwartz D.C., Patente US. 4, 473, 452**);
- b) los que forman tiras planas y largas que se cortan para formar bloques independientes;

c) los que forman barras o varillas largas de agarosa que se cortan para formar bloques independientes (Birren B. y Lai E. **Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical guide**, Academic Press, New York, 1993, 29-30).

5 En esos moldes se generan muestras que por lo general son de dimensiones mayores que los pocillos del gel. Por eso, se recomienda que para que los bloques posean las dimensiones de los pocillos del gel es necesario cortarlos con un bisturí o cualquier otro implemento (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 40, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to**
10 **170-3673. Bio-Rad**).

Tanto en las cámaras CHEF, TAFE, MiniCHEF y MiniTAFE, las desigualdades introducidas por los cortes en los bloques de muestras influyen en la calidad del patrón electroforético. Se conoce que el grosor del bloque que contiene la muestra de ADN
15 influye en la resolución y el tiempo de electroforesis. Sin embargo, no se han estudiado detenidamente los efectos que provocan en los patrones electroforéticos las desigualdades en las formas y dimensiones de los bloques que se depositan en los pocillos del gel. Tampoco se han estudiado los efectos que provocan la mala alineación de los bloques en el origen de migración. En consecuencia, los investigadores han
20 empleado los moldes formadores de bloques mencionados en el párrafo anterior. Sin embargo, ellos no incluyen aditamentos de corte que permitan obtener muestras iguales en su forma y en sus dimensiones, las que además coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel.

Si se considera que el patrón de bandas que se obtiene en cada carrilera del gel al final
25 de la electroforesis depende de que todas las moléculas de una talla dada, salgan juntas y aproximadamente al unísono del bloque y del pocillo, es decir, que el frente de migración entre en el gel de separación formando una banda fina y recta, se comprende la importancia de los accesorios que se requieren para preparar los bloques y para alinearlos en los pocillos. Cuando el frente de migración se deforma en el origen
30 de migración, el mismo se mantiene deformado durante toda la electroforesis, pues en la cubeta no existe ninguna otra fuerza ni aditamento capaz de corregirlo. Los defectos al preparar los bloques y los problemas de alineación de los bloques en los pocillos son

reproducidos exactamente en las bandas separadas en el patrón, pudiendo llegar a obtenerse bandas que no son rectas y que poseen ondulaciones. Por tanto, podemos concluir que hasta el momento no se ha considerado importante preparar bloques de tamaños iguales cuyas dimensiones coincidan con la de los pocillos de los geles.

5

Por otro lado, en la **patente US. 5, 457, 050** de 1995 de GH Mazurek se reportó un molde para inmovilizar las células y tratarlas en el interior del mismo. Se propuso que ese molde pudiera ser desechable o reusable según el material empleado en su construcción. Además de que ese molde prolonga el tiempo de preparación de muestras, él tampoco tiene asociado un aditamento para cortar los bloques de muestras y así garantizar que en todos los pocillos del gel se depositen muestras similares.

10

IV.- El patrón electroforético y la tensión de los electrodos

15

Los equipos TAFE Geneline I y Geneline II fijan sus cuatro electrodos de alambre de platino entre las dos paredes paralelas de acrílico (**Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco Division of Beckman Instruments, 1988**). Uno de los extremos de cada electrodo se extiende hacia la tapa continuamente, más allá de la zona útil, hasta salir fuera del alcance de la solución tampón y de la cámara y se une, a través de un conector, con el generador de voltajes externo. Así se garantiza la continuidad eléctrica y la polarización correcta. Para que no forme parte del electrodo, la parte del alambre de platino que se prolonga hasta la tapa se cubre con un capilar plástico de elevada constante dieléctrica, aislándose así de la solución tampón. Como es conocido, los electrodos de platino sufren desgaste en la electroforesis de campos pulsantes. Por eso, el sistema que se emplea en el TAFE para colocar los electrodos tiene la desventaja que, a medida que se usa, el electrodo va perdiendo su tensión y se dobla u ondula por varias zonas, siendo difícil tensarlo nuevamente, pues se requiere desmontar el electrodo, lo cual no está al alcance del experimentador de manera sencilla. Cuando los electrodos se doblan u ondulan, las líneas isopotenciales en el gel se distorsionan y provocan distorsión de las líneas de fuerza del campo eléctrico, provocando que las bandas no migren en un frente fino y recto.

20

25

30

Por otro lado, la forma de fijar los electrodos en los equipos TAFE representa un gasto excesivo de platino. Por ejemplo el equipo GeneLine I utiliza aproximadamente un metro de alambre de platino mientras que los electrodos activos solo requieren treinta centímetros. El equipo Geneline II tiene un diseño similar.

5

En el CHEF Mapper, los electrodos (en forma de J) se fijan en soportes de un material de elevada constante dieléctrica de forma que uno de sus extremos lo atraviese (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4 y 65, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673.**

10

Bio-Rad). Los soportes se insertan en el fondo de la cámara. De esta forma el alambre de platino atraviesa el piso de la cámara y puede unirse eléctricamente al circuito de imposición de voltajes. Para sellar el piso de la cámara se usa un sellante de silicona y anillos de goma que se comprimen con una tuerca. La forma de fijar los electrodos en los equipos CHEF ahorra platino al no tener que sacarlos por fuera de la solución. Sin embargo, no garantiza que los electrodos mantengan su grado de tensión a medida que se usen y por tanto pueden provocar discretas deformaciones de las líneas de fuerza de los campos eléctricos.

15

20

Al igual que los equipos TAFE, los equipos MiniTAFE y MiniCHEF reportados (**Riverón A.M. y cols, Anal. Lett, 1995, vol. 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**) extienden el alambre de platino después de los electrodos hasta sacarlos de la cámara por encima del nivel de la solución tampón. Así garantizan la comunicación necesaria entre los electrodos dentro de la cámara con los circuitos electrónicos exteriores que los polarizan. Las partes del alambre de platino que no funcionan como electrodos son cubiertos con mangueras de un material de elevada constante dieléctrica para evitar el contacto con la solución. Las cámaras de tipo TAFE utilizan electrodos que miden al menos todo el ancho del gel y quedan suspendidos entre las paredes laterales de las cámaras. Con el uso pierden tensión y se ondulan parcialmente lo que distorsiona los patrones de bandas. Además, esto significa un gasto adicional de platino que encarece estas cámaras.

25

30

Recientemente, se reportó un sistema para cámaras MiniTAFE de ancho variable (Patente Cubana, No. de solicitud: 135/2000). En ese sistema se colocaron los cátodos en la parte inferior de la cámara. Denominaron el mismo como *configuración TAFE invertida*. Esa configuración es ventajosa, por cuanto evita accidentes con los electrodos al colocar el gel. Sin embargo en la patente mencionada no se reivindican otros parámetros de la cámara sobre la base de la separación entre los electrodos de polaridades opuestas, lo que está relacionado con la optimización de las cámaras.

Los métodos de empleo de las cámaras de electroforesis de campos pulsantes.

Existen métodos para seleccionar las condiciones de corrida en equipos de ECP. Por ejemplo, el CHEF Mapper de la Bio-Rad posee una opción de autoalgoritmo y otra de algoritmo interactivo (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. 31-40 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad**). Las dos opciones permiten calcular los tiempos de pulso, la duración de las rampas de tiempos de pulso, el ángulo de reorientación, el campo eléctrico y el tiempo óptimo de corrida para separar las moléculas de ADN de una muestra dada. A diferencia del autoalgoritmo en el que se asumen condiciones fijas para las variables, el algoritmo interactivo permite variar el tiempo, temperatura, concentración del tampón y el tipo y concentración de agarosa. Ambos algoritmos funcionan sobre la base de datos empíricos y teóricos colectados durante 5 años de experiencias (**Bio-Rad Catalogue. Life Science Research Products 1998/99. Bio-Rad Laboratories, 185**), pero los propios fabricantes recomiendan que al autoalgoritmo se le introduzcan tallas superiores e inferiores a las que se desean separar. También que se considere que si el rango de tallas que se introduce, como datos en el autoalgoritmo y en el programa interactivo, es grande los algoritmos pueden brindar resultados erróneos, tales como la inversión de la movilidad de las moléculas en el centro del gel.

Existen otras expresiones empíricas que brindan la duración de los pulsos eléctricos que separarían un grupo de moléculas cuyas tallas están comprendidas entre un valor dado y otro mayor llamado RSL (Resolution Size Limit) (**Smith D.R. Methods I, 1990, 195-203**). Sin embargo, esa relación sólo es válida en algunas condiciones

experimentales y no predice la resolución entre dos moléculas cualesquiera. También existe una función que brinda las condiciones aproximadas de campo eléctrico y tiempo de pulso que separarían un grupo dado de moléculas (**Gunderson K. y Chu G. Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 3348-3354**). Debe notarse que sólo permite estimar
5 aproximadamente esos dos valores, pero no brinda la migración de las moléculas en cualquier condición experimental.

A pesar de que existen múltiples estudios teóricos acerca de la reorientación de las moléculas de ADN durante la ECP (**Noolandi J., Adv. Electrophoresis, 1992, 5, 1-57; Maule J., Mol. Biotech., 1998, 9, 107-126**), ellos aún no han brindado un resultado
10 práctico de utilidad en los laboratorios. Es decir, no han generado métodos que permitan que el usuario de la ECP seleccione fácilmente las condiciones que debe emplear en la separación de las moléculas que desea estudiar.

Las ecuaciones propuestas por López-Cánovas L. y cols. (**López-Cánovas L. y cols, J. Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139**) para describir la migración de las moléculas de
15 ADN en ECP tampoco han sido extendidas para seleccionar las condiciones experimentales que deben aplicarse en un equipo cualquiera cuando se varían el tiempo del pulso, el campo eléctrico y la temperatura.

Hasta el momento, las condiciones experimentales que se aplican en los equipos de ECP provienen más de la experiencia del usuario en el uso de los sistemas de ECP
20 que de ecuaciones que describan la migración del ADN. No existe un método infalible que prediga cuales tiempos de pulso y duraciones de los experimentos deben emplearse cuando varían las variables de corrida. Tal método es particularmente importante cuando se trabaja con las mini-cámaras de los mini-equipos, pues en ellos se pueden emplear campos eléctricos intensos, lo que no es común en los restantes
25 sistemas de ECP.

ESENCIA DE LA INVENCION

La presente invención brinda mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes de
30 tipo CHEF y TAFE de dimensiones óptimas, aunque muchas de las innovaciones propuestas son aplicables también a las cámaras de dimensiones mayores. De esta forma, la invención permite aplicar campos eléctricos elevados, realizar la electroforesis

en geles y reducir las duraciones de las electroforesis sin perder resolución entre las moléculas ni la alta capacidad de análisis de muestras.

La invención parte de la existencia de sistemas para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje en las cámaras de electroforesis de tipo CHEF y TAFE.

5 Un sistema como el reportado por Maule (**Maule J. y Green D.K. Anal. Biochem. 1990 191, 390-395**) u otro similar es apropiado para la correcta polarización de los electrodos. También parte de la base de que se dispone de fuentes de poder, intercambiador externo de calor, recirculador para termostatar la solución tampón en la cámara, así como los reactivos químicos y biológicos necesarios para llevar a cabo el
10 proceso de electroforesis de grandes moléculas de ADN. La invención aquí propuesta brinda:

- i) Mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes (ECP) de los sistemas CHEF y TAFE, que permiten recircular la solución tampón a alto flujo sin que se formen turbulencias en la cámara y separan las moléculas rápidamente en
15 patrones de bandas que son reproducibles en todas las carrileras del gel y entre electroforesis efectuadas en momentos diferentes.
- ii) Un conjunto de accesorios que permiten formar geles planos sin que existan irregularidades de ningún tipo en su superficie.
- iii) Un conjunto de accesorios para preparar muestras de tamaños y formas
20 similares a la de los pocillos de los geles.
- iv) Métodos para su empleo, el que incluye un método de calcular el tiempo de electroforesis para diferentes valores de campo eléctrico y temperatura en las cámaras y un sistema para tensar los electrodos de las cámaras TAFE, el cual garantiza que a cualquier altura del gel y a todo su ancho existan líneas
25 isopotenciales que no estén deformadas.

En conjunto estas cámaras, accesorios y métodos permiten separar en geles, de manera rápida y reproducible, grandes moléculas de ADN, empleando agarosa, en un rango de concentraciones entre 0,5 y 1,5%. Más particularmente, las cámaras,
30 accesorios y métodos de esta invención poseen las siguientes características distintivas:

- i) Emplean geles rectangulares o cuadrados en los que pueden llegar a depositarse hasta 34 muestras. Esa cantidad de muestras depende del ancho del gel, valor que a su vez depende de la distancia que separa los electrodos de polaridad opuesta en las cámaras. Las dimensiones de la cámara y la cantidad de solución tampón que emplean también dependen de la separación entre los electrodos de polaridades opuestas.
- ii) Brindan resultados reproducibles en virtud de que tanto las cámaras como los accesorios garantizan corriente eléctrica homogénea en toda la solución tampón y buena alineación de las muestras en el origen de migración. También se garantiza que se mantenga el grado de tensión de los electrodos.
- iii) Son capaces de separar rápidamente, al menos en 2,5 horas, a las moléculas de ADN de tamaños hasta 2 mega pares de bases,
- iv) Poseen un método para calcular la duración de la electroforesis cuando se varía el campo eléctrico, la temperatura y la duración de los pulsos eléctricos que se aplicarán durante el proceso de electroforesis de las moléculas de ADN, proceso que se lleva a cabo en un gel que está sumergido en la solución tampón dada en la que se aplican secuencialmente y con cierta duración pulsos eléctricos en dos direcciones diferentes en relación con el gel. Ese tiempo también depende de la separación entre los electrodos de polaridades opuestas.

A.- El cálculo de las dimensiones de los geles, las áreas de las cámaras y las cantidades de muestras que pueden depositarse en los pocillos.

Para llevar a cabo este cálculo nombraremos 'd' a la separación entre los pares de electrodos de polaridades opuestas. Las dimensiones recomendadas para ancho y largo de los geles del CHEF (cm) y la base de la cámara donde se pone el arreglo hexagonal de electrodos son:

$$\begin{aligned}\text{ancho del gel rectangular} &= d / (2 \cdot \cos(30^\circ)) \\ &= d / 1,732\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{largo} &= d \cdot \{1 - 1 / [2 \cdot \cos^2(30^\circ)]\} \\ &= d / 3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{lado del gel cuadrado} &= d \cdot \{1 - 1 / [2 \cdot \cos^2(30^\circ)]\} \\ &= d/3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{área de la base de la cámara} &= [2 + (d / \cos(30^\circ))] \cdot [6 + d] \\ &= [2 + (d / 0,87)] \cdot [6 + d]\end{aligned}$$

5

Se consideró que las paredes laterales de la cubeta debían estar separadas un centímetro de los electrodos y que el sistema de limitación de las turbulencias en el tampón (que se explicará más adelante) debería ocupar 2 cm en cada lado, en la entrada y la salida del tampón. Esa consideración explica los valores constantes de 2 y 6 de las fórmulas del área de la base de la cámara. Si acotamos 'd' entre 6,2 cm y 15 cm, entonces:

10

- los anchos del gel rectangular están comprendidos entre 3,6 y 8,7 cm,
- los largos entre 2,1 y 5 cm, según sea 'd',
- 15 - las áreas entre 7,6 y 43,5 cm²,

- los lados del gel cuadrado están comprendidos entre 2,1 y 5 cm, según sea 'd',
- las áreas entre 4,4 y 25 cm²,

20

- las áreas de la base de la cámara entre 111,3 y 404,1 cm²

si el nivel del tampón en la cámara debe sobrepasar 0,3 cm al gel, entonces el volumen de tampón queda definido por

25

$$\text{volumen del tampón} = \{[2 + (d / \cos(30^\circ))] \cdot [6 + d]\} \cdot (0,3 + \text{grosor del gel})$$

si el grosor de los geles está entre 0.35 y 0,5 cm entonces el volumen de tampón estará entre 72,3 y 323,3 mL.

30

El largo (en cm) del gel del TAFE es:

$$\begin{aligned}\text{largo del gel} &= d \cdot \sin(31^\circ) \\ &= d \cdot 0,515\end{aligned}$$

mientras que su ancho es igual al largo de los electrodos. El área (cm²) de la pared que sostiene el gel está dada por $[6 + 1,4 \cdot d] \cdot [2 + \text{sen}(32,5^\circ) \cdot d]$
 $[6 + 1,4 \cdot d] \cdot [2 + 0,54 \cdot d]$.

- 5 Si acotamos 'd' entre 6,2 y 15 cm, entonces los largos de los geles del TAFE están comprendidos entre 3,2 y 7,7 cm, mientras que su ancho puede ser cualquiera de los definidos en la patente de Riverón y cols. del año 2000, lo cual se incorpora a esta invención totalmente como referencia (**Patente Cubana, No. de solicitud: 135/2000**). Por tanto, el área del gel del MiniTAFE y el volumen de tampón en la cámara dependen
 10 del ancho que se seleccione y se calcula como es usual. El área de la pared que sostiene el gel estará entre 78,5 y 272,7 cm².

La cantidad máxima de bloques que puede depositarse en los geles queda definida según sus anchos 'a' en cm como:

15

Cantidad de bloques a depositar en los geles = $(a - 0,2) / 0,25$

Estando la cantidad máxima en los geles rectangulares de 3,6 y 8,7 cm entre 13 y 34 bloques, respectivamente.

20

B.- La obtención de patrones de bandas reproducibles en las cámaras provistas en esta invención.

Como ya se mencionó, las cámaras provistas en esta invención se distinguen por:

- 25 i) Poseer un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución tampón y además homogeniza la temperatura y composición del tampón en la cámara de electroforesis,
- ii) Disponer de un sistema para introducir o retirar los electrodos en la cámara de electroforesis, el que además garantiza que se mantenga el grado de tensión de los electrodos. Ese sistema que emplea tapones elásticos que se colocan en
 30 orificios perforados en el piso o en las paredes laterales de las cámaras. Por la luz de dichos tapones se pasan los electrodos.

- iii) Disponer de un sistema para que el experimentador pueda tensar los electrodos de la cámara MiniTAFE.

En esta invención también se proveen un grupo de accesorios que son importantes para lograr patrones de bandas reproducibles. Ellos son:

- iv) Un sistema que permite preparar geles planos. Ese sistema garantiza la homogeneidad de todas las dimensiones de los geles.
- v) Un sistema que permite alinear en el origen de migración del gel a los bloques que contienen las muestras.
- vi) Un sistema para preparar bloques de tamaños homogéneos.

B.1.-Sistemas limitadores de turbulencias y homogeneizadores de la conductividad y temperatura del tampón en la cámara.

Es bien conocido que en las cercanías de los electrodos el tampón cambia sus propiedades conductivas debido a la electrólisis que ocurre en los electrodos. Esto es particularmente importante en el CHEF, que posee un ordenamiento hexagonal de múltiples electrodos que rodean al gel. Por eso, en esas regiones de la cámara la conductividad ' σ ' del tampón puede ser diferente del valor de conductividad en otras regiones de la cámara. Esto es crítico en las mini-cámaras CHEF. La recirculación del tampón electroforético a alto flujo es equivalente a agitar dicha solución, pues es la manera de garantizar homogeneidad de la conductividad de todo el tampón de la cubeta de electroforesis. Por ejemplo, un recambio del volumen total de la cubeta en 3 minutos es suficiente para este fin.

Cuando ese electrolito recircula a alto flujo se generan turbulencias del fluido en la cámara. Otro posible origen de las turbulencias es que algunas bombas peristálticas que se emplean, inyectan el tampón en porciones como si fueran pulsos de líquido.

El sistema de recirculación del tampón a alto flujo desarrollado en esta invención se basa en el siguiente principio: Es necesario garantizar que el área de sección transversal al paso de la corriente en el tampón donde se sumerge el gel, sea constante en toda la cámara de electroforesis. Así se impide que la corriente que recircula en la cámara se modifique aleatoriamente por los cambios locales de

resistencia del tampón provocados por la presencia de olas, remolinos o turbulencias durante la recirculación. El principio se fundamenta en que la resistencia (R) del tampón de un electrolito cualquiera que se deposita en la cámara de electroforesis está dada por:

- la conductividad del electrolito (σ),
- la separación entre los electrodos de polaridades opuestas (d),
- el área de sección transversal al paso de la corriente (A).

Estas variables se relacionan según la formula (1).

$$R = (1 / \sigma) \cdot (d / A) \quad (1)$$

Por eso cuando 'A' es diferente en zonas de la cámara, 'R' también lo es y la corriente eléctrica 'I' también.

15 El sistema limitador de turbulencias en las cámaras CHEF está formado por:

- i) dos tipos de láminas rectangulares, las de tipo I y las de tipo II, las que son de cualquier material de elevada constante dieléctrica,
- ii) láminas que son del ancho del interior de la cámara, siendo las de tipo I de al menos 2 cm de altura y las de tipo II de 0,5 cm de altura,
- iii) láminas de tipo I que están despegadas de la base de la cámara una distancia entre 0,02 y 0,05 cm y siempre sobresalen de la solución tampón que se deposita en la cámara, de tal forma que al recircular el tampón por el interior de la cámara, este fluye solamente entre las láminas de tipo I y la base de la cámara,
- iv) láminas de tipo II que están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón, de tal forma que al recircular el tampón en la cámara, este fluye solamente por encima de las láminas de tipo II,
- v) donde ambos tipos de láminas se ubican en la entrada y en la salida de la solución tampón de la cámara, desde la pared de entrada o salida de las mangueras hacia el interior de la cámara de electroforesis y en el siguiente orden, lámina de tipo I después lámina de tipo II, repitiendo 'n' veces ese par de

láminas, donde 'n' es un valor entero entre 1 y 4 y quedando la última lámina aproximadamente a 1 cm de los electrodos, última lámina que debe ser de tipo I.

Así, el tampón proveniente del intercambiador de calor choca con la lámina de tipo I al caer en el interior de la cámara y pasa por debajo de ella. Después vuelve a chocar con la de tipo II y pasa sobre esa otra lámina. Hechos estos que se repiten con cada par de láminas del sistema limitador de turbulencias, hasta que dicho tampón pasa al compartimiento donde se encuentran los electrodos y el gel y lo atraviesa. Después el tampón sufre el mismo proceso en la región de la cámara desde la cual sale el tampón hacia el intercambiador de calor. Así se logra amortiguar cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

El sistema de limitación de turbulencias de la solución tampón en las cámaras TAFE está formado por:

- i) dos láminas iguales y del mismo tamaño de las paredes de la cámara que son paralelas a los electrodos,
- ii) láminas estas que son de un material de elevada constante dieléctrica y poseen una ranura horizontal en su tercio inferior,
- iii) ranura que es del largo de los electrodos y de 0,3 cm de altura,

En este sistema las láminas están ubicadas, una de ellas en la entrada de la solución tampón y la otra en la salida de dicha solución. De esa forma, dividen la cámara en tres compartimentos: el central que contiene los electrodos y el gel, y los otros dos, por los que entran o salen las mangueras de la recirculación. Durante la recirculación, el tampón cae directamente en uno de esos compartimentos y de ahí fluye hacia el compartimiento de electroforesis pasando por la ranura horizontal. Del compartimiento de electroforesis sale pasando por la ranura horizontal de la otra lámina y cae en el compartimiento donde se encuentra la manguera de salida. De este último sale hacia el intercambiador de calor. Así se amortigua cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

B.2.-Sistema de accesorios para garantizar homogeneidad de la corriente en el gel.

Si se sigue el razonamiento anterior se comprende que si el gel, o matriz sobre la cual se realiza la electroforesis posee irregularidades, brindará un área (A) de sección transversal a la corriente que difiere entre sus diferentes regiones. Por tanto, 'Rm' (resistencia al paso de la corriente en el gel) tiene que mantenerse constante en todas

5 las regiones del gel.

El sistema para formar geles de caras planas es en un dispositivo desarmable que consta de:

- i) una base plana,
- 10 ii) dos marcos, uno de ellos con una cavidad de forma rectangular y el otro con una cavidad cuadrada de 0,35 a 0,5 cm de espesor, los que poseen dos muescas donde se coloca un peine de dientes largos para formar el gel con sus pocillos, donde el espesor de los marcos y las dimensiones internas de las cavidades determinan las dimensiones del gel que se va a preparar para ser colocado como matriz de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE,
- 15 iii) dos tapas, la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, y la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine,
- iv) un segundo peine similar al anterior pero que posee dientes más cortos y permite empujar las muestras que se depositaron en los pocillos del gel.

20 Los peines de dientes largos que imprimen los pocillos en el gel, son en su parte anterior totalmente lisos y continuos con los dientes, mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes están engrosados, formándose un escalón. Los peines provistos poseen dientes iguales de espesor comprendido entre 0,03 y 0,1 cm, ancho entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm y longitud de los dientes igual al

25 espesor del gel menos 0,15 cm. Así, al ensamblarse el peine, el marco y la base plana, los dientes quedan separados 0,1 cm de la base y el escalón posterior queda 0,1 cm más alto que el espesor del marco. Los peines de dientes cortos son iguales a los peines de dientes largos, pero sus dientes son 0,2 cm más cortos.

30 La tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, posee dos caras planas. En uno de sus bordes tiene un reborde saliente que encajará en el marco al ser ensamblado el sistema. La tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine,

tiene una cara plana y la otra también plana, pero está rebajada en forma de cuña en uno de sus extremos.

El sistema se emplea de la siguiente forma:

- i) sobre la base plana se coloca uno de los dos marcos, específicamente el que posee el tamaño del gel que se desea preparar,
- ii) se encajan las patas de uno de los peines de dientes largos en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, con lo cual quedarán los dientes separados 0,1 cm de la superficie de la base plana,
- iii) la tapa 1, que encaja en la parte delantera del peine, se coloca sobre el marco y por delante del peine, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada hacia arriba y la rebaja en forma de cuña pegada al peine,
- iv) dicho conjunto se inmoviliza apretando las tapas contra el marco por cualquier medio hasta que la cavidad que se forma entre ellos quede eliminada y se vierte el gel fundido a una temperatura apropiada, que cuando es agarosa está entre 65 y 70 °C,
- v) la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, se coloca sobre el marco, por detrás del peine, introduciendo el reborde en el escalón del peine de dientes largos, y se deja el sistema en reposo hasta que dicho gel solidifique,
- vi) se retira el peine de dientes largos y en la ranura en forma de cuña de la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, se colocan los bloques de gel que contienen las moléculas de ADN inmovilizadas, los que se hacen resbalar hacia los pocillos empujándolos con un aplicador cualquiera,
- vii) una vez colocados los bloques en los pocillos del gel, dichos bloques se empujan hacia el fondo de los pocillos con la ayuda del peine de dientes más cortos, lo cual se hace encajando sus patas en las muescas que posee el marco, lo que garantiza que ellos se introduzcan hasta el fondo de los pocillos,

Así se garantiza que se obtenga un gel plano, sin meniscos, en el cual todas las muestras fueron colocadas a la misma altura y a la misma distancia del borde posterior o anterior del gel. Todo lo anterior se logra sin que ocurra aplastamiento o ruptura de dichos bloques.

El sistema para formar geles planos y el limitador de turbulencias impiden que el área de sección transversal del gel varíe incontroladamente, por la formación de meniscos en las paredes del recipiente empleado para formar el gel o entre los pocillos del gel.

5 B.3.- Sistema de accesorios para formar bloques de tamaños homogéneos.

No obstante, aunque se garantice que el valor de 'R' sea constante en todo el tampón de la cámara y en el gel, si los bloques de agarosa que contienen las moléculas de ADN inmovilizada no son todos de dimensiones similares y se colocan en línea recta en el gel, sin romperlos y a la misma distancia de los bordes anteriores y posteriores de los geles, entonces los patrones de bandas resultan distorsionados.

Los accesorios para preparar muestras de ADN incluidas en bloques de gel de dimensiones homogéneas y similares a la de los pocillos del gel donde serán depositados constan de:

- 15 i) formadores de bloques de gel que consisten cada uno de ellos en una lámina plana de cualquier material impermeable con espesor mayor que 0,5 cm, lámina que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo, donde el ancho de cada ranura es de 0,2 cm, su profundidad es del espesor de los dientes de un peine dado, la que puede ser entre 0,03 y 0,1 cm, existiendo formadores para todos los posibles espesores de los dientes de todos los peines que pueden emplearse para imprimir los pocillos en el gel,
- 20 ii) otra lámina plana y rígida de material impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques,
- iii) cortadores de bloques, donde cada uno es una barra que posee patas en sus extremos, lo que le confiere la forma de una 'U' invertida, cuadrada y tan o más
25 larga que las ranuras del formador de bloques, teniendo en la parte inferior de la barra varias protuberancias en forma de cuchillas, transversales a la longitud mayor de la barra y con el filo hacia abajo, donde el largo del extremo afilado de cada cuchilla es 0,2 cm y cada cuchilla sobresale por debajo de la barra más de 0,1 cm, estando las cuchillas de cada formador separadas una distancia
30 específica que puede ser entre 0,1 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm,
- iv) poseen un método de empleo.

El uso de estos accesorios incluye los siguiente pasos:

- i) se prepara una suspensión de células en agarosa que se mantiene a 45 °C y se ambienta el formador de bloques y su tapa a 45 °C,
- ii) se vierte dicha suspensión en las ranuras del formador de bloques,
- 5 iii) se cubre el formador de bloques con su tapa y se coloca a temperatura ambiente o en frío,
- iv) se espera a que solidifique el gel,
- v) una vez solidificado el gel se coloca el cortador de bloques a lo largo de la primera ranura, con sus cuchillas hacia abajo y los filos transversales a la
- 10 dimensión mayor de la ranura,
- vi) se presiona hacia abajo el cortador de bloques,
- vii) se retira el cortador, se inclina el formador de muestras y se empujan los bloques hacia el interior de un recipiente que contiene la solución apropiada para el tratamiento de los bloques,
- 15 viii) se repite el proceso con las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del formador,

Así se garantiza que los bloques formados sean todos iguales y sus dimensiones coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel donde serán depositados para someter después a las moléculas de ADN al proceso de electroforesis.

20

B.4.- Sistema de tensión de electrodos para evitar distorsiones de las líneas isopotenciales en las cámaras de electroforesis

En esta invención se consideró que para que el gradiente de potencial aplicado a las moléculas durante la electroforesis no varíe aleatoriamente, es necesario que las líneas

25 isopotenciales en el gel no estén distorsionadas. Eso se logra si los electrodos mantienen su estado de tensión. Para lograrlo, en esta invención se introdujeron los electrodos en la cámara a través de agujeros perforados en la base de las cámaras CHEF o en las paredes de las cámaras TAFE. En los agujeros se colocan entonces tapones elásticos de silicona, por cuya luz pasan los electrodos que provienen del

30 exterior. Así se garantiza que, aunque el electrodo adelgace por su uso en la electroforesis de campos pulsantes, siempre estará aprisionado por el tapón y por tanto tensado.

En el sistema TAFE los electrodos son además largos. Por eso, en ocasiones, ellos se arquean. Para evitar ese problema, en esta invención se dotó a las cámaras TAFE de un sistema para tensar los electrodos. El sistema consta de:

- 5 i) un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, la que está atravesada por un orificio,
- ii) orificio este, por donde se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,
- iii) un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

10 Este sistema se coloca en la salida del electrodo de la cámara. Los electrodos los tensa el experimentador mediante el siguiente procedimiento:

- i) Se afloja el prisionero que inmoviliza al vástago en el cual está insertado el electrodo,
- ii) Se hace girar el vástago el ángulo requerido para que queden tensos dichos electrodos,
- 15 iii) Se aprieta el prisionero para inmovilizar al vástago en su posición actual y mantener tenso el electrodo.

De esta forma se garantiza la existencia de líneas isopotenciales sin distorsión a todo lo ancho del gel vertical del TAFE.

- 20 En esta invención se garantizan los patrones reproducibles ya que se emplea un sistema adecuado para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje y estos se mantienen tensos, además se emplean sistemas para garantizar que las migraciones de las moléculas de ADN de cualquier tamaño no sean perturbadas por cambios locales transitorios en la resistencia del tampón o del gel. Esos cambios
- 25 provocan distorsiones en las carrileras de migración y en las bandas que forman las moléculas después del proceso de electroforesis.

C.- Métodos de empleo de las cubetas de esta invención y método de cálculo para seleccionar el tiempo de electroforesis en las cámaras

- 30 En esta parte de la invención se creó un método de cálculo en el cual se estima el tiempo de electroforesis para condiciones diferentes de campo eléctrico, temperatura y duración de pulsos eléctricos. Se basa en que existe un conjunto de ecuaciones que

describen la migración por pulso 'm' de una molécula lineal de ADN en los equipos CHEF (López-Cánovas L y cols, J. of Chromatogr. A 1998, 806, 123-139) las que se incorporan totalmente como referencia.

$$m = v_r \cdot t_p \cdot \Gamma(tp-tr) + v_m \cdot (tp-tr) \cdot [1 - \Gamma(tp-tr)]$$

donde

$$v_r = 0,0207 \cdot [Q \cdot E^{1,45} / (8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1,35})];$$

$$v_m = 0,665 \cdot [Q \cdot E^{1,76} / (8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1,08})];$$

$$tr = 0,134 \cdot (L^{1,14} / v_r)^{0,926};$$

$$\Gamma(tp-tr) = 1 \text{ si } (tp-tr) \leq 0 \text{ y } \Gamma(tp-tr) = 0 \text{ si } (tp-tr) > 0.$$

En estas relaciones las variables y parámetros tienen las siguientes definiciones:

'tr' es el tiempo de reorientación (en seg) de una molécula de ADN lineal,

15 'vr' y 'vm' son las velocidades de migración (en cm/segundos) de dicha molécula durante y después de la reorientación, respectivamente,

'Q' es la carga neta de la molécula (en statcoulomb) dada por $1e^- \cdot bp$, donde 'e⁻' es la carga del electrón y 'bp' los pares de bases,

'L' el largo del contorno (en cm) de la molécula lineal de ADN, dado por $0,34 \text{ nm} \cdot bp$,

20 'E' es la intensidad del campo eléctrico en statvolts/cm,

'η' es la viscosidad del tampón en Poises, calculada interpolando el valor de la temperatura experimental en un polinomio que relaciona la viscosidad del agua con la temperatura (en °C) experimental,

'tp' es la duración del pulso (seg).

25

Para alimentar el método se calcula primero la migración por pulso 'm' de la molécula más pequeña. Esto se realiza:

- i) suministrando a las relaciones anteriores los valores de campo eléctrico, temperatura y tiempo de pulso que se emplearán en la electroforesis,
- 30 ii) suministrando a las relaciones anteriores el tamaño, en pares de bases 'bp', de la molécula de ADN más pequeña que se desea separar,

- iii) calculando 'm' siempre y cuando el campo eléctrico y la temperatura estén comprendidos entre 5,8 y 16 V/cm y entre 10 y 30 °C, respectivamente, y asumiendo que en el proceso de electroforesis se emplea agarosa al 1,5 % y como tampón de electroforesis TBE 0,5x (TBE 1x: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.4).

Una vez que se dispone de la migración por pulso, este valor se emplea para alimentar al método de cálculo del tiempo de electroforesis. En dicho método el tiempo de electroforesis (t_e , en segundos) se calcula como:

$$t_e = [(D/m) \cdot 2 \cdot t_p]$$

El método requiere además como dato la distancia 'D' en centímetros que se desea que la molécula más pequeña migre en el gel. El valor preferente de 'D' es la distancia entre el origen de migración y el borde inferior del gel menos 0,1 ó 0,2 cm. Según el método los tiempos de electroforesis a 30 °C están comprendidos entre 1,5 y 9 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente, mientras que para 10 °C ellos están entre 2,5 y 14,5 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente.

Todos los pasos anteriores garantizan el correcto empleo de la cubeta y que cuando se aplica la misma intensidad de campo eléctrico, temperatura, tiempo de electroforesis, concentración de tampón, de gel y duración de los pulsos eléctricos se obtienen los mismos patrones de bandas. El método para llevar a cabo el proceso de electroforesis en las cubetas de invención, con la ayuda de los métodos y accesorios mencionados se resume en los siguientes pasos:

- i) se conecta la cámara a los dispositivos de alternar los campos eléctricos y se energizan los electrodos, se llena la cámara con solución tampón, se conecta la cámara al intercambiador externo de calor, se verifica que el sistema limitador de turbulencias está correctamente ubicado y se recircula la solución tampón a través de la cámara hasta que se alcance la temperatura deseada,
- ii) con la ayuda de los accesorios para preparar geles planos y empleando el peine apropiado se preparan geles para la separación de las grandes moléculas de ADN, geles que son de hasta 0,5 cm de espesor según la cámara seleccionada,

iii) se depositan en los pocillos del gel los bloques de gel que contienen las moléculas de ADN que serán separadas, las que estaban previamente incluidas en dichos bloques, siendo las dimensiones de los bloques similares a la de los pocillos del gel,

5 iv) se detiene temporalmente la recirculación y el gel que contiene los bloques se sumerge en la solución tampón que ya se encuentra a la temperatura deseada, se restaura la recirculación,

10 v) se calcula el tiempo de electroforesis que separará a las moléculas de ADN empleando un método de cálculo que depende de las condiciones experimentales que serán empleadas y del largo del gel en el que se realizará la electroforesis,

vi) se energiza el sistema y se realiza la electroforesis de las moléculas de ADN sobre el gel de caras planas, llevando a cabo la recirculación de la solución tampón a alto flujo,

15

A modo de resumen, las cámaras de esta invención son pequeñas, poseen distancias entre sus electrodos de polaridades opuestas que determinan todas sus dimensiones. A pesar de que son cámaras electroforéticas pequeñas, sus geles son lo suficientemente largos para evidenciar la separación de las grandes moléculas de ADN en patrones de bandas. Pueden analizarse hasta 34 muestras en un solo gel. Por tanto, las cámaras admiten gran cantidad de muestras, lo cual las convierte en una nueva herramienta para estudios que requieran resultados rápidos y la comparación de los resultados que brindan numerosas muestras. Este proceso puede realizarse en poco tiempo, con poco gasto de reactivos y de material biológico.

20

25 A continuación se muestran varios ejemplos de realización de las cámaras y accesorios provistos en esta invención.

30

Ejemplos de realización:

Ejemplo 1. Mini-cámara de tipo CHEF

- 5 En la figura 1 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo CHEF. Dentro de un arreglo hexagonal de dieciocho electrodos 11 se coloca un gel 12 de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. El gel 12 se fija en su posición con soportes en forma de escuadra 13 pegados a una base 14 que se introduce en una depresión 19 del piso de la cámara. Dentro del gel 12 se colocan moléculas de ADN de
- 10 talla cromosómica inmovilizadas en bloques 15 del mismo material o uno similar. Los bloques 15 conteniendo las moléculas de ADN se colocan en posición tal que al ser sometidos a un campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo a su talla en un patrón con bandas rectas y reproducible entre las carrileras. La cámara se llena con una
- 15 solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas.

- La temperatura, pH, concentración y otros parámetros de la solución deben mantenerse homogéneos en toda la cámara y constantes durante todo el proceso de separación de las moléculas (electroforesis). Por esta razón se mantiene un
- 20 intercambio constante entre la solución de la cámara y un volumen extra que se coloca en un medio termostatado.

- Para lograr la homogeneidad de la solución es importante que la recirculación del mismo se efectúe a un flujo elevado. La solución se añade a la cámara por la entrada 16 y se recoge por la salida 17. Después de la entrada 16 y antes de la salida 17 se
- 25 encuentra un sistema 18 para limitar la formación de turbulencias en la solución. En la figura se señalan dos láminas de tipo I que se desensamblaron para que se pueda ver la lámina de tipo II en el fondo de la cámara. Las turbulencias en la solución afectan la homogeneidad del campo eléctrico en la cámara y provocan distorsión en los patrones de bandas.

En la tabla I se presenta algunas dimensiones físicas de mini-cámaras CHEF que no son limitativas del alcance de esta patente pero son ilustrativas de las cámaras que se desean proteger.

5

Tabla I. Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo CHEF.

Cámara	MiniCHEF 1	MiniCHEF 2	MiniCHEF 3
Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm)	11,6	6,2	11,6
Cantidad de electrodos	18	18	36
Área de la base de la cámara (cm ²) incluyendo el limitador de turbulencias	272	94	272
Volumen de solución tampón en la cámara (mL)	225	80	225
Dimensiones del gel cuadrado (cm)	4 x 4 x 0,5	2,2 x 2,2 x 0,2	4 x 4 x 0,5
Dimensiones del gel rectangular (cm)	7 x 4 x 0,5	3,6 x 2,2 x 0,2	7 x 4 x 0,5
Cantidad de muestras de 0,15 cm de ancho en el gel rectangular	27	13	27

Ejemplo 2. Mini-cámara de tipo TAFE

- 10 En la figura No. 2 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo TAFE de configuración de electrodos de tipo *TAFE invertido*. El gel 21 que es también de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz se coloca verticalmente en medio de los dos electrodos positivos 22 y lo dos negativos 23. Los bloques 24 que contienen las moléculas de ADN se colocan en posición tal que al ser sometidos a un
- 15 campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo a su talla en un patrón de bandas recto. La cámara se llena con una solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas. Para la recirculación de la solución, esta se añade a la cámara por la entrada 25 y se recoge por la salida 26. Después de la entrada 25 y antes de la salida
- 20 26 se encuentra un sistema 27 para limitar la formación de turbulencias en la solución

En la tabla 2 se presentan algunas dimensiones físicas de mini-cámaras MiniTAFE que no son limitativas del alcance de esta patente pero ilustran las cámaras que se desean proteger.

Tabla 2. Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo TAFE.

Cámara	MiniTAFE 1	MiniTAFE 2
Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm)	7,8	10
Área de la pared donde se fijan los electrodos (cm ²) incluyendo el limitador de turbulencias	127,7	166,8
Dimensiones de la cámara (cm)	15,2 x 7,1 x 8,4	20,1 x 6 x 8,3
Volumen de solución tampón (mL)	530	800
Dimensiones del gel (cm)	7 x 4 x 0,5	6,3 x 5,2 x 0,4
Cantidad de muestras de 0,15 cm de ancho	27	24

Ejemplo 3. Parámetros eléctricos de algunas mini-cámaras de esta invención

5

La distancia entre los electrodos de polaridad opuesta que tienen estas cámaras (menor o igual a 15,0 cm) permite aplicar campos eléctricos de hasta 25 V/cm en el TAFE y 16 V/cm en el CHEF, cuando se llenan con TBE 0,5x (TBE 1x: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,4), empleando fuentes de poder cuya salida de potencia máxima no excede 300 Watt y a voltajes menores a 375,0 V. La resistencia eléctrica de estas cámaras es de varios miles de Ohm, esto es debido al poco volumen de solución que se emplea. Por esta razón se puede alcanzar intensidades campo eléctrico elevadas utilizando fuentes de poca potencia máxima.

10

15

En la tabla III se muestra los parámetros eléctricos y el consumo de energía eléctrica de algunas cámaras como las que se presentan en esta invención. En este caso las mediciones se hicieron con los volúmenes de solución TBE 0,5x descritos en las tablas I y II a una temperatura de 20 °C.

20

Tabla III. Parámetros eléctricos de las mini-cámaras CHEF y TAFE.

Cámara	MiniCHEF 1		MiniTAFE 1	
Campo eléctrico aplicado (V/cm)	10	16	8	20
Voltaje aplicado (V)	116,0	185,5	62,4	156,0
Intensidad de Corriente (mA)	85,0	139,9	63,4	168,0
Potencia aplicada (Watt)	9,8	26,0	4,0	26,2

Ejemplo 4. Forma de fijar los electrodos en las mini-cámaras CHEF y TAFE

En la figura 3 se muestra la forma en que se fijan los electrodos de las mini-cámaras de tipo CHEF y TAFE en sus posiciones. Los electrodos son un alambre 31 de platino de diámetro aproximado 0,05 cm. Ellos son los que transmiten la energía eléctrica desde un circuito electrónico externo hacia la solución que se encuentra en el interior de las cámaras para establecer el campo eléctrico que provoca la migración y separación de las moléculas de ADN.

El fondo 32 de las cámaras de tipo CHEF y dos de los laterales 33 (los mismos que sostienen el gel) de las cámaras de tipo TAFE se perforan para permitir el paso del alambre de platino que formará el electrodo. Para mantener tensos los electrodos e impedir la fuga de solución por estos orificios se insertan los alambres 31 en la luz de un tapón elástico 34 u otro material muy flexible que se adapte perfectamente al orificio y al alambre 31 aunque este adelgace con el uso.

Ejemplo 5. Ejemplo de sistema para preparar geles con caras planas

Un elemento esencial para la obtención de patrones de bandas rectos y reproducibles en estas cámaras es la forma de los geles 12 y 21. Las caras de estos deben ser perfectamente planas o se alteraría la homogeneidad del campo eléctrico en su interior y se distorsionaría el patrón. En la figura 4 se muestra la vista posterior de los accesorios que se emplean para preparar los geles 12 y 21.

Los geles 12 y 21 se preparan sobre una base 41 de superficies planas y suficientemente grande como para contener un marco 42. El espesor del marco 42 determinará el grosor del gel que se fundirá. Las dimensiones del espacio interior 43, también de superficies planas, determinarán el ancho y el largo de los geles 12 y 21.

En el perímetro exterior del marco 42 se encuentran las ranuras 44. Las mismas se encuentran cerca y a la misma distancia de uno de los bordes del marco 42. En las

ranuras 44 se insertarán las patas 46 del peine 45 por lo que el ancho de las ranuras 44 es el mismo que el de las patas 46. La profundidad de ambas ranuras 44 es la misma y de forma tal que la distancia entre las caras interiores de las ranuras 44 sea igual a la distancia entre los bordes interiores de las patas 46.

5

El peine 45 tiene, además, dientes 47 cuyos grosores se afinan para que sus secciones transversales sean iguales a la de los bloques 15 y 24. Los dientes 47 quedan hacia una de las caras del peine 45 y su longitud es igual al grosor del marco 42 menos 1,0 mm, por detrás de los peines queda un escalón. Las patas 46 tienen esta misma longitud. En la figura 4 se muestra la ampliación de uno de los dientes 47 y donde se aprecia el escalón.

10

La tapa 50 es de caras planas y uno de sus bordes está rebajado en forma de cuña 51, por lo que una de las caras planas es mayor que la otra. Se muestra la ampliación de una sección del borde en forma de cuña 51. El ancho de la tapa 50, al menos por el borde rebajado en forma de cuña 51, es mayor que el ancho del espacio interior 43 del marco 42.

15

La tapa 53 tiene también caras planas excepto por un borde donde tiene el saliente 54 de 0,1 cm de espesor. Se muestra la ampliación de una sección del saliente 54. El ancho del saliente 54 es mayor que el del espacio interior 43 del marco 42 pero menor que la distancia entre las caras interiores de las patas 46. El peine 55 es similar al peine 45 pero sus dientes 56 son 0,2 cm más cortos.

20

Para preparar el gel se coloca la base 41 sobre una superficie horizontal, sobre ella se pone el marco 42 con las muescas hacia atrás. El peine 45 se inserta en las ranuras 44 de forma que los dientes 46 queden hacia delante. Luego se pone la tapa 50 sobre el marco 42 y por delante del peine 45 con la cara plana mayor hacia abajo y el borde con la rebaja 51 en forma de cuña pegado al peine. Las flechas indican la dirección en que se ensamblan los accesorios. El conjunto se inmoviliza apretando el marco 42 contra la base 41 con ayuda de presillas u otro dispositivo. Por detrás del peine 45 se vierte la agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. La temperatura de este

30

líquido en el caso de las agarosa fundida es de 65 a 70 °C. Para otros materiales puede variar la temperatura a que se vierte. El volumen de gel fundido a añadir debe ser suficiente para llenar la cavidad que queda entre la base 41, las paredes del espacio 43 del marco 42 y la tapa 50 y que se forme un menisco detrás del peine 45.

- 5 Luego se coloca la tapa 53 con la cara plana hacia abajo y el borde saliente 54 pegado al peine 45 por detrás, esto elimina el volumen de gel fundido sobrante. Todo el conjunto se deja reposar hasta que el material solidifique.

- 10 Cuando el gel 12 ó 21 se haya formado se retira el peine 45 y se colocan los bloques 15 ó 24 en los pocillos 57 formados al retirar los dientes 47. Como la sección transversal de los dientes 47 es igual a la de los bloques 15 y 24 estos quedan uniformemente colocados a todo lo ancho y a la misma distancia del borde del gel 12 ó 21. Cuando se han colocado todos los bloques 15 y 24 que se deseen, se empujan hacia adentro del gel 12 ó 21 con ayuda del peine 55 y entonces quedan también a la
15 misma profundidad.

- Al utilizar adecuadamente los accesorios descritos se preparan geles de caras perfectamente planas y los bloques con las moléculas de ADN inmovilizadas quedan perfectamente alineados. Esta es una de las condiciones necesarias para obtener
20 patrones de bandas rectos y repetitivos.

Ejemplo 6. Tipos de geles de las mini-cámaras CHEF. Forma de colocarlos en las mini-cámaras.

- 25 En las mini-cámaras de tipo CHEF se puede colocar geles de diferentes tamaños. Para fijar el gel 12 (figura 5) en una posición fija durante la electroforesis se utiliza una base 14 rectangular de plástico o acrílico. Sobre la base 14 se colocan cuatro piezas 13 en forma de escuadra. Las escuadras 13 se colocan de forma que rodeen las cuatro esquinas de un rectángulo o cuadrado donde se colocará el gel 12. La distancia entre
30 las caras interiores de las escuadras 13 es igual a las dimensiones (largo y ancho) del gel 12 que se colocará. La altura de las escuadras 13 no debe ser mayor de 0,2 cm para que no se conviertan en obstáculos que deformen el campo eléctrico que se

establece en la cámara.

La base 14 se coloca en el fondo de la cámara en el centro de los electrodos 11. En esta zona de la cámara se encuentra una depresión 19 con forma rectangular y con las mismas dimensiones de la base 14. La profundidad de la depresión 19 es igual al espesor de la base 14 para que el gel 12 quede a nivel con el resto del piso de la cámara. La base 14 tiene algunas rebajas 61 en las bordes y las esquinas para facilitar su extracción cuando termina el experimento. Todas las bases 14 son idénticas excepto por la posición de las escuadras 13. De esta forma se pueden utilizar geles 12 de diferente tamaño en la misma cámara. Es importante que todo el sistema garantice que el gel 12 quede perfectamente centrado durante las electroforesis para obtener los patrones electroforéticos rectos y reproducibles.

Al realizar una electroforesis se toma el gel 12 con los bloques 15 que contienen las moléculas de ADN colocados (preparado con ayuda de los accesorios descritos en el ejemplo 5) y se coloca sobre la base 14 entre las cuatro escuadras 13. Luego se toma la base 14 con el gel 12 encima y se coloca en la depresión 19 del fondo de la cámara. Es importante que los bloques 15 queden hacia la zona donde se encuentran los cátodos puesto que las moléculas de ADN en solución y a pH neutro se cargan negativamente y migran hacia los ánodos. Cuando se termina la electroforesis el gel 12 se extrae para teñirlo y visualizar el patrón de bandas. Si se desea utilizar un gel 12 de diferente tamaño o limpiar la cámara se extrae la base 14 introduciendo un palillo en las rebajas 61 de la base 14 y haciendo palanca.

Ejemplo 7. Sistema para tensar los electrodos de las mini-cámaras TAFE.

Los electrodos de las mini-cámaras TAFE pueden distenderse con el uso. En la figura 6 se muestra un dispositivo para tensar los alambres de platino 31 que forman los electrodos. El vástago 65 tiene una rebaja en forma de cintura 66 en la que se perfora un orificio 67 de diámetro ligeramente superior al del alambre de platino 31. El alambre 31 se introduce por el orificio 67 y se hace girar el vástago 65 con ayuda de un destornillador a través de la ranura 68 hasta tensar el alambre 31. Para fijar la posición

del vástago 65 se utiliza un prisionero 69 que se afloja antes de tensar el alambre 31 y se aprieta luego.

Ejemplo 8. Sistema limitador de turbulencias en las mini-cámaras CHEF

5

Las mini-cámaras de tipo CHEF poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la recirculación de la solución a flujos altos.

10

En la figura 7 se muestra en detalle el sistema que limita la formación de turbulencias en la solución para las cámaras de tipo CHEF. El mismo está formado por láminas impermeables de tipo I 71 y de tipo II 72 de un material de elevada constante dieléctrica para no afectar el campo eléctrico aplicado.

15

Las láminas de tipo I 71 son más altas y se colocan despegadas del piso de la cámara de forma que la solución no pueda nunca desbordarse por encima de ella sino que siempre pase por debajo. Las láminas de tipo II 72 son más bajas, se pegan al piso de la cámara y su altura es siempre mayor que la separación entre las láminas de tipo I 71 y el piso de la cámara.

20

Las láminas de tipo I 71 y de tipo II 72 se colocan alternadamente comenzando y terminado con una lámina de tipo I 71 y colocando entre ellas láminas del tipo II 72. Los conjuntos de láminas de tipo I 71 y de tipo II 72 se colocan después de la entrada 16 y antes de la salida 17 y se puede poner tantas láminas de tipo I 71 y de tipo II 72 como se desee hasta 1,0 cm de distancia de los electrodos.

25

La solución es inyectada por la entrada 16 y pasa alternadamente por debajo de las láminas de tipo I 71 y por encima de las láminas de tipo II 72. Esta trayectoria sesgada (indicada por las flechas) va amortiguando los cambios de presión que se producen en la inyección de forma tal que al pasar por encima del gel 12 el flujo de solución es casi constante y no posee turbulencias.

30

En el otro extremo de la cámara donde se recoge la solución por la salida 17 ocurre el

mismo proceso.

Ejemplo 9. Sistema limitador de turbulencias de las mini-cámaras TAFE

- 5 Las mini-cámaras de tipo TAFE también poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la recirculación de la solución a flujos altos.

En la figura 8 se muestran detalles del sistema de limitación de turbulencia en la solución de las mini-cámaras de tipo TAFE.

10

El sistema esta formado por láminas impermeables 81 de material de elevada constante dieléctrica que ocluye totalmente el paso de la solución que se inyecta por la entrada 25 y se recoge por la salida 26 excepto por las ranuras 82. Las variaciones de presión que se producen en la solución al ser inyectadas y extraídas de la cámara son amortiguadas en las cavidades 83 y al pasar por la zona donde está el gel 21 el flujo de la solución es casi constante y no provoca turbulencias. Las flechas indican la trayectoria que sigue el tampón desde que se inyecta por la entrada 25 hasta que se recoge por la salida 26.

15

20

El flujo máximo que puede aplicarse a estas cámaras sin que se formen turbulencias en la solución de forma apreciable varía con el tamaño y volumen de las cámaras. En la tabla IV se muestra el flujo máximo que pudo ser alcanzado en algunas de las cámaras como las que se presentan en los ejemplos 1 y 2 sin que se formaran turbulencias apreciables en la solución.

- 25 Tabla IV. Flujo máximo de recirculación de la solución tampón en las mini-cámaras de ECP sin que se formen turbulencias en la solución.

Cámara	Volumen (mL)	Flujo máximo sin turbulencias (mL/minuto).	Tiempo de recambio de la solución (minutos).
MiniCHEF 1	225	100	2,25
MiniTAFE 1	530	280	1,89
MiniCHEF 2	80	44	1,82

Tiempo de recambio de la solución se refiere al tiempo que se necesita para cambiar todo el volumen de la solución en la cámara.

Ejemplo 10. Sistema para preparar los bloques de muestras.

Como ya se mencionó es imprescindible disponer de bloques de muestras idénticos en formas, dimensiones y concentración de ADN para obtener reproducibilidad en los patrones de bandas. Esos bloques a su vez deben poseer dimensiones y formas similares a la de los pozos formados en el gel de electroforesis.

En la figura 9 se muestra uno de los sistemas diseñados para obtener bloques con las características mencionada en el párrafo anterior. El sistema está compuesto por el aplicador 91, el manipulador 92, el formador de bloques 93, su tapa 94 y el cortador de bloques 95.

En el ejemplo, el formador de bloques 93 es una lámina rectangular (7 x 6,9 x 1 cm longitud x ancho x espesor) de acrílico, goma o silicona con caras planas y pulidas; una de las caras de mayor área tiene once ranuras superficiales 96 que son rectangulares y paralelas. Ellas están espaciadas a todo lo ancho, de tal forma, que el ancho de la ranura coincide con el alto del bloque de muestra 98 y la profundidad de la ranura 96 coincide con el grosor de los bloques de muestras 98.

Sobre la cara ranurada del formador de bloques 93 se coloca la tapa 94, la cual es otra lámina rígida de acrílico o vidrio completamente plana. Ambas partes, 93 y 94 se mantienen unidas para garantizar la hermeticidad entre los canales de fundición que forman las ranuras 96. Con la ayuda de una pipeta se rellenan las ranuras con una suspensión de células en agarosa apoyando la punta de la pipeta en el extremo de cada uno de los canales de fundición. La mezcla se vierte con cuidado de llenarlos completamente y se deja en reposo el sistema hasta que la agarosa solidifique.

La tapa 94 se retira, deslizándola transversalmente a las ranuras 96 para no arrastrar las tiras 97 de la agarosa solidificada. Las tiras 97 se cortan en pequeños bloques 98 con el cortador 95. Para ello se apoya el filo de los dientes 99 perpendicularmente y sin corrimientos contra la cara inferior de cada ranura 96. La distancia entre los dientes del cortador definen el ancho de los bloques 98, de esta forma se garantiza que todos los bloques 98 que contienen las muestras de ADN queden con la misma forma y dimensiones.

Una vez cortados los bloques 98, el aplicador 91 se usa para arrastrarlos por las ranuras 96 y así dejarlos caer en los recipientes que contienen las soluciones de

tratamiento de las células. El aplicador 91 también sirve para colocar los bloques 98 en los pocillos 57 (figura 4) del gel de electroforesis. El manipulador 92 se utiliza para extraer los bloques del recipiente donde se tratan para la preparación de las moléculas de ADN o del frasco donde se almacenan para su conservación.

5

Ejemplo 11: Patrones de bandas de los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* separados en una mini-cámara TAFE.

10

En la figura 10 se muestra un ejemplo de electroforesis en una mini-cámara TAFE de 7,8 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa mini-cámara emplea un gel 101 de 7,0 cm de ancho y 4,0 cm de largo. En el gel 101 fueron depositados trece bloques 102 de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de profundidad. Los bloques 102 contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas 103 en cada una de las carrileras 104 del gel. Cada patrón de bandas posee once bandas. Las condiciones de electroforesis fueron 60,0 segundos de tiempo de pulso, 7,0 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5x, 20 °C, 10,0V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.

15

20

Estos resultados indican que la mini-cámara TAFE brinda rápidamente buena separación de las bandas en el patrón electroforético y resultados reproducibles en las diferentes carrileras del gel.

Ejemplo 12: Reproducibilidad de los Patrones de bandas obtenidos en mini-cámaras CHEF.

25

30

En la figura 11 se muestran los resultados de tres corridas electroforéticas en una mini-cámara CHEF de 11,6 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa cámara emplea geles cuadrados 111, 112 y 113 de 4,0 cm de lado. En los geles 111, 112 y 113 fueron depositados siete bloques 114, 115 y 116 de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de profundidad. Los bloques 114, 115 y 116 contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas 118, 119 y 120 en cada una de las

carrileras 121, 122 y 123 de los tres geles 11, 112 y 113. Las condiciones de electroforesis fueron 50,0 segundos de tiempo de pulso, 3,5 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5x, 20 °C, 9,82 V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.

- 5 En la figura puede observarse que los patrones separados en cada gel 111, 112 y 113 poseen igual cantidad de bandas en todas las carrileras. Además, cada banda 118, 119 y 120 migró la misma distancia en las siete carrileras 121, 122 y 123 de un gel 111, 112 y 113 cualquiera. Por otro lado, en cada carrilera 121, 122 y 123 de los tres geles 111, 112 y 113 se aprecia el mismo patrón electroforético, el que posee igual número
- 10 de bandas 118, 119 y 120, indicando que la mini-cámara brindó resultados reproducibles en experimentos diferentes, los que se obtuvieron en un tiempo breve de 3,5 horas.

Se adjuntan las siguientes figuras:

- 15 **Figura 1.** Vista isométrica en explosión de un esquema de una mini-cámara CHEF. Se muestran la cámara con su base de electrodos y la tapa de dicha cámara. También se muestran la base del gel cuadrado con sus pestañas, el gel y un bloque hipotético de muestras. Se aprecian desmontadas las láminas de tipo I del sistema para limitar las
- 20 turbulencias. En la base de la cámara puede apreciarse una lámina de tipo II.

- Figura 2.** Vista isométrica del esquema de una mini-cámara TAFE con electrodos dispuestos en configuración TAFE invertida. En la figura, la pared delantera se dibujó transparente para que puedan apreciarse los detalles interiores de la cámara. En el centro de la cámara se observa el gel rodeado por los cuatro electrodos. A ambos
- 25 lados de los electrodos se muestran las láminas ranuradas del sistema para limitar las turbulencias en el tampón.

- Figura 3.** Forma de fijar los electrodos a las paredes o a la base de las mini-cámaras CHEF y TAFE. En la parte superior se muestra un corte transversal de una parte de la base del CHEF y en la inferior de una parte de la pared del TAFE. En ellas se observa
- 30 el electrodo insertado dentro del tapón horadado de silicona.

- Figura 4.** Vista posterior del sistema de accesorios para preparar los geles con caras planas y el peine para alinear los bloques en el gel.

En la parte inferior de la figura se observa la base para fundir el gel, después un esquema del gel con sus pocillos de aplicación y un bloque hipotético de muestras.

Sobre el gel se encuentra la tapa delantera del molde, el marco con sus ranuras y la tapa trasera del molde.

- 5 En la parte superior se muestra el esquema de un peine formador de pocillos y el peine para alinear las muestras en el gel. Las flechas indican la dirección de ensamblaje de los accesorios.

Figura 5. Parte superior: esquema de una vista superior de las mini-cámaras CHEF. Se muestran el arreglo hexagonal de electrodos y la depresión donde se colocan las bases portadoras de los geles.

Parte inferior izquierda: base con el gel rectangular.

Parte inferior derecha: base con el gel cuadrado.

Figura 6. Dispositivo para tensar los electrodos de las mini-cámaras TAFE.

- 15 En la izquierda: Se muestra el vástago con el prisionero aflojado y el alambre de platino a la entrada del vástago. Las flechas indican la dirección en que se ensamblan las piezas.

En la derecha: Se muestra el vástago con el alambre pasado y enrollado alrededor de la cintura del vástago, el vástago rotado y el prisionero apretado.

Figura 7. Vista lateral de un esquema del sistema limitador de turbulencias en las mini-cámaras CHEF donde la pared se dibujó transparente.

En el centro de la figura se observa el gel horizontal.

A los lados se observan las láminas de tipo I y II, colocadas alternadamente a ambos lados del gel.

Las flechas indican el flujo del tampón en la cámara de electroforesis.

- 25 **Figura 8.** Vista lateral de un esquema del sistema limitador de turbulencias en las mini-cámaras TAFE donde la pared se dibujó transparente.

En el centro de la figura se observa el gel vertical.

A los lados se observan las láminas del sistema limitador de turbulencias colocadas a ambos lados del gel.

- 30 Las flechas indican el flujo del tampón en la cámara de electroforesis.

Figura 9. Accesorios para formar bloques que contienen muestras de ADN inmovilizadas de tamaños iguales y homogéneos.

En la parte inferior de la figura se muestra el manipulador de bloques e inmediatamente el aplicador de bloques en el gel.

Sobre ambos se muestra la lámina formadora de muestras con sus ranuras longitudinales y un grupo de tiras de agarosa solidificada y cortadas en bloques.

- 5 También se muestran tiras de agarosa solidificadas y sin cortar. La tapa de la lámina se muestra más arriba. En la parte superior de la figura se muestra el cortador de muestras y otro grupo de muestras ya cortadas.

Figura 10. Patrones electroforéticos obtenidos en una mini-cámara TAFE. Se separaron los cromosomas de muestras de ADN intacto de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizados en trece bloques de agarosa. Condiciones de electroforesis: 60 seg de tiempo de pulso, siete horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5x, 20 °C, 10,0 V/cm. El gel es de 4,0 cm de longitud y 7,0 cm de ancho. Tinción del gel con bromuro de etidio.

- 15 **Figura 11.** Patrones electroforéticos obtenidos en tres experimentos diferentes en una mini-cámara CHEF. En cada experimento, se separaron los cromosomas de muestras de ADN intacto de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizados en siete bloques de agarosa. Condiciones de electroforesis: 50,0 segundos de tiempo de pulso, 3,5 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5x, 20 °C, 9,82 V/cm. Se empleó el gel cuadrado de 4,0 cm. Tinción del gel con bromuro de etidio.

VENTAJAS DE LAS SOLUCIONES PROPUESTAS.

Las mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes, accesorios y los métodos desarrollados y descritos en esta patente presentan las siguientes ventajas:

5

- 1- Brindan cámaras que consumen poco espacio de laboratorio y poca cantidad de reactivos químicos y biológicos. Es decir emplean poca cantidad de solución tampón y poca muestra biológica.
- 2- Se brinda un método para construir las mini-cámaras de tipo CHEF y TAFE, sus geles y el volumen de solución a emplear en las mini-cámaras. El método solo
10 parte de la distancia entre los electrodos de polaridades opuestas.
- 3- A pesar de que las cámaras emplean poco volumen de tampón y permiten la recirculación del tampón a alto flujo para homogeneizar la conductividad de la solución, en ellas se obtienen patrones de bandas reproducibles, en virtud de que
15 poseen un sistema limitador de turbulencias en la solución tampón.
- 4- Al proveerse cámaras pequeñas, en ellas se pueden aplicar campos eléctricos altos usando fuentes de poca potencia, por lo que la electroforesis se hace en poco tiempo. Como norma general los tiempos de electroforesis para separar moléculas de hasta 2 mega pares de bases son de aproximadamente 8 horas.
- 5- Los accesorios para preparar los geles y colocar las muestras permiten preparar
20 geles de caras planas y colocar las muestras perfectamente alineadas. Esto unido a que la solución empleada puede ser recirculada a un flujo alto sin que se formen turbulencias contribuye a obtener patrones de bandas rectos y repetitivos.
- 6- El sistema de tensar los electrodos evita ondulaciones en los electrodos y por
25 tanto, evita que ocurra distorsión de las líneas de fuerza del campo eléctrico, contribuyendo así a la reproducibilidad de los patrones de bandas.
- 7- El sistema de tensión de electrodos facilita, además, que los electrodos del TAFE puedan ser tensados por el experimentador cuando pierden tensión con el uso. El sistema de tensión también tiene asociado un sistema de tapones elásticos que
30 sellan los orificios por donde pasan los electrodos, lo que evita la fuga de solución tampón aunque el diámetro de los electrodos se reduzca a causa del desgaste.

- 8- Se brinda un sistema para preparar bloques delgados de dimensiones que coinciden con los huecos de los pocillos de los geles.
- 9- El sistema de colocar los electrodos en las cámaras permite ahorrar alambre de platino. Ya que las cámaras son pequeñas, también se ahorran los demás materiales empleados en su construcción, disminuyendo los costos.
- 10- Se provee un método de empleo de las cámaras que se basa en ecuaciones que describen la migración de las moléculas de ADN en electroforesis de campos pulsantes. Este método permite determinar los tiempos de electroforesis para condiciones experimentales diferentes.
- 11- Los geles que emplean las mini-cámaras son lo suficientemente grandes para brindar los patrones de bandas bien resueltos y así ser útiles en aplicaciones analíticas y preparativas. También son lo suficientemente anchos para admitir hasta 34 muestras en un solo experimento.

CÁMARA DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

REIVINDICACIONES.

5

1.- Cámara de electroforesis de campos pulsantes de tipo TAFE o CHEF para la separación de moléculas de ADN, donde se emplea un sistema para energizar los electrodos en las cámaras y alternar la dirección de aplicación de los campos eléctricos así como un sistema para recircular el tampón, caracterizada por,

10

i) depender sus dimensiones así como la cantidad de muestras a analizar de la distancia 'd' que separa los pares de electrodos de polaridad opuesta, la cual se encuentra entre 6,2 y 15 cm,

ii) poseer electrodos que se mantienen tensos por la acción de un sistema de fijación en las cámaras de tipo CHEF y uno de fijación y tensión en las de tipo TAFE,

15

2.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las dimensiones de un gel rectangular que se emplea en las cámaras de tipo CHEF son $d/3$ centímetros de longitud y $d/1,732$ centímetros de ancho 'a', estando comprendidos el ancho entre 3,6 y 8,7 cm y la longitud entre 2,1 y 5 cm.

20

3.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque la longitud y el ancho 'a' de un gel cuadrado que se emplea en la cámara de tipo CHEF es de $d/3$ centímetros y están comprendidas entre 2,1 y 5 cm.

25

4.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque la longitud del gel que se emplea en las cámaras de tipo TAFE es $d \cdot 0,515$ centímetros, estando los valores comprendidos entre 3,2 y 7,7 cm.

30

5.- Cámara de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 1, 2 y 3 caracterizada porque emplea geles de ancho 'a' en los que se puede analizar en una

corrida una cantidad de muestras que se calcula de acuerdo a la relación $(a - 0,2) / 0,25$

6.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las bases de las cámaras de tipo CHEF poseen un área en centímetros cuadrados que se calcula a partir de 'd' según la fórmula $[2+(d/0,87)] \cdot [6+d]$, donde los valores de las áreas están comprendidos entre 111,3 y 404,1 cm².

7.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las paredes laterales que soportan el gel y los electrodos en las cámaras TAFE tienen un área en centímetros cuadrados que se calcula a partir de 'd' según la fórmula $[6+1,4 \cdot d] \cdot [2+0,54 \cdot d]$, donde los valores de las áreas están comprendidos entre 78,5 y 272,7 cm².

8.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque los electrodos, que se mantienen fijos por la acción de un sistema de fijación en las cámaras de tipo CHEF y TAFE provienen del exterior de la cámara, se energizan con una fuente externa de poder durante el proceso de electroforesis y se ponen en contacto con la solución tampón atravesando la luz de tapones elásticos que se insertan en orificios horadados en las bases de las cámaras de tipo CHEF o en las paredes que sostienen al gel de las cámaras de tipo TAFE, tapones que sirven para fijar dichos electrodos a la cámara.

9.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 8 caracterizada porque los tapones elásticos que mantienen fijos los electrodos y ocluyen los orificios de las cámaras por donde pasan los electrodos para comunicarse con el exterior pueden ser de silicona, goma u otro material elástico cualquiera.

10.- Cámara de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las cámaras de tipo TAFE poseen un sistema de tensión de los electrodos que atraviesan las paredes de dicha cámara el cual es colocado a la salida de cada electrodo de la cámara y que consiste en:

- i) un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, la que está atravesada por un orificio,
- ii) orificio por donde se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,
- 5 iii) un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

11.- Accesorios para cámaras de electroforesis de campos pulsantes caracterizados por estar compuestos de:

- 10 i) un sistema desarmable para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón,
- ii) un sistema desarmable para formar geles de electroforesis de caras planas sin irregularidades ni meniscos entre los pocillos donde serán colocados los bloques de muestras, pocillos que son impresos en el gel por piezas en forma de peine, donde cada una tiene varios dientes iguales, existiendo varios peines que
15 difieren entre sí en los anchos y espesores de sus dientes,
- iii) un sistema desarmable para formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados, el cual posee varios formadores que difieren entre sí en el tamaño de los bloques que pueden ser formados.

20

- 12.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 11 caracterizados porque en las cámaras de tipo CHEF el sistema desarmable para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón posee dos tipos de láminas rectangulares, tipo I y tipo II hechas de un material de elevada constante dieléctrica y
25 que son del ancho del interior de la cámara, siendo las de tipo I de al menos 2 cm de altura y las de tipo II de 0,5 cm de altura.

- 13.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 12 caracterizados porque las láminas de tipo I se encuentran despegadas de la
30 base de la cámara a una distancia entre 0,02 y 0,05 cm y sobresalen de la solución tampón que se deposita en la cámara de tal forma que al recircular el tampón por el

interior de la cámara este fluye solamente entre las láminas de tipo I y la base de la cámara.

- 14.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 12 caracterizados porque las láminas de tipo II están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón de tal forma que al recircular el tampón en la cámara este fluye solamente por encima de las láminas de tipo II.

- 15.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 12 caracterizados porque ambos tipos de láminas se ubican en la entrada y en la salida de la solución tampón de la cámara, desde la pared de entrada o de salida de las mangueras hacia el interior de la cámara de electroforesis en el siguiente orden: lámina de tipo I después lámina de tipo II, repitiendo 'n' veces ese par de láminas, donde 'n' es un valor entero entre 1 y 4 y quedando la última lámina aproximadamente a 1 cm de los electrodos y siendo dicha última lámina de tipo I.

- 16.- Accesorios para cámaras de electroforesis acuerdo con la reivindicación No. 11 caracterizados porque para las cámaras de tipo TAFE los accesorios para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón están conformados por dos láminas hechas de un material de elevada constante dieléctrica iguales entre sí y del mismo tamaño de las paredes de la cámara ubicadas en paralelo al plano que contiene a los electrodos de un mismo lado y que poseen una ranura horizontal en su tercio inferior, siendo dicha ranura del largo de los electrodos y de hasta 0,5 cm de altura.

- 17.- Accesorios para cámaras de electroforesis acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 16 caracterizados porque dichas láminas se ubican una de ellas en la entrada de la solución tampón y la otra en la salida de dicha solución, dividiendo la cámara en tres compartimentos: uno central que contiene los electrodos y el gel, y otros dos laterales por los que entra o sale el tampón.

18.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 11 caracterizados porque el sistema desarmable para formar geles de caras planas está formado por,

- i) una base plana,
- 5 ii) dos marcos de 0,35 a 0,5 cm de espesor, donde uno de ellos posee una cavidad de forma rectangular y el otro una cavidad cuadrada y ambos poseen dos muescas para colocar un peine de dientes largos, y donde el espesor de los marcos y las dimensiones internas de las cavidades determinan el ancho 'a', la longitud y el espesor del gel que se va a utilizar como matriz de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE,
- 10 iii) un peine de dientes largos donde las dimensiones de los dientes determinan las dimensiones de los pocillos donde se depositan los bloques de muestras,
- iv) dos tapas, una tapa 1 que encaja en la parte delantera del peine y una tapa 2 que encaja en la parte trasera del peine,
- 15 v) un segundo peine similar al anterior pero de dientes cortos para empujar y alinear los bloques de muestras que se depositaron en los pocillos del gel.

19.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 18 caracterizados porque el peine de dientes largos en su parte anterior es liso mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes está engrosado formándose un escalón, siendo dichos dientes iguales y cuyas dimensiones son: espesor entre 0,03 y 0,1 cm, ancho entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm, y longitud igual al espesor del gel menos 0,1 cm.

20- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 11 y 18 caracterizados porque los dientes del peine de dientes cortos son iguales a los del peine de dientes largos aunque 0,2 cm más cortos.

21- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicación No. 11 y 18 caracterizados porque la tapa 2 o tapa que encaja en la parte trasera del peine posee dos caras planas y en uno de sus bordes tiene un reborde saliente y la tapa 1 o

tapa que encaja en la parte delantera del peine tiene una cara plana y la otra también plana pero rebajada en forma de cuña en uno de sus extremos.

22.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 11 caracterizados porque el sistema desarmable para formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados consta de:

- i) varios formadores de bloques de muestras que consisten cada uno en una lámina plana de un material impermeable con espesor mayor de 0,5 cm la que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo, donde el ancho de cada ranura es de 0,2 cm, su profundidad es del espesor de los dientes de un peine dado, la que puede ser entre 0,03 y 0,1 cm, existiendo formadores para todos los posibles espesores de los dientes de todos los peines de dientes largos que pueden emplearse para imprimir los pocillos en el gel,
- ii) otra lámina plana y rígida de material impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques de muestras,
- iii) varios cortadores de bloques de muestras, donde cada uno es una barra tan o más larga que las ranuras del formador de bloques de muestras y posee patas en sus extremos lo que le confiere la forma de una 'U' invertida, cortadores que tienen en su parte inferior varias protuberancias en forma de cuchillas que son transversales a su longitud mayor y cuyo borde afilado sobresale más de 0,1 cm hacia abajo y posee una longitud es 0,2 cm, estando las protuberancias o cuchillas de cada cortador separadas una distancia específica que puede ser entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm.

23.- Procedimientos para el empleo de las cámaras y accesorios de electroforesis de campos pulsantes para la separación de moléculas de ADN, donde las cámaras se conectan a través de mangueras con un sistema que recircula la solución tampón entre un intercambiador de calor externo y dichas cámaras, y se usa un sistema para energizar los electrodos en las cámaras y alternar la dirección de aplicación de los campos eléctricos, donde dichos procedimientos comprenden:

- I. un método de empleo del sistema desarmable para preparar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados,
- II. un método de empleo del sistema desarmable para formar geles de caras planas,
- III. un método de empleo de las cámaras y accesorios para llevar a cabo el proceso de electroforesis,
- IV. un método de tensar los electrodos en las cámaras de tipo TAFE.

24.- Método de empleo según la reivindicación No. 23 caracterizado porque para utilizar el sistema desarmable para preparar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados, se realizan los siguiente pasos:

- i) se prepara una suspensión de células en gel de agarosa que se mantiene a 45°C y se ambienta el formador de bloques de muestras y su tapa a 45 °C,
- ii) se vierte dicha suspensión en las ranuras del formador de bloques de muestras,
- iii) se cubre el formador de bloques de muestras con su tapa y se coloca a temperatura ambiente o en frío,
- iv) se espera a que solidifique la suspensión de células en gel de agarosa,
- v) una vez solidificado el gel se coloca el cortador de bloques de muestras a lo largo de la primera ranura, con sus cuchillas hacia abajo y con los bordes afilados transversales a la dimensión mayor de la ranura,
- vi) se presiona hacia abajo el cortador de bloques de muestras y luego se retira,
- vii) se inclina el formador de bloques de muestras y se empujan los bloques de muestras hacia el interior de un recipiente que contiene una solución para su tratamiento,
- viii) se repite el proceso con las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del formador de bloques de muestras.

25.- Método de empleo según la reivindicación No. 23 caracterizado porque para utilizar el sistema desarmable para formar geles de caras planas se llevan a cabo los siguientes pasos:

- i) se coloca el marco sobre la base plana,
- ii) se encajan las patas del peine de dientes largos en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, quedando los dientes separados 0,1 cm de la superficie superior de la base plana,
- 5 iii) la tapa 1 o tapa que encaja en la parte delantera del peine, se coloca sobre el marco y por delante del peine de dientes largos, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada hacia arriba y la rebaja en forma de cuña pegada al peine de dientes largos,
- 10 iv) el sistema ensamblado hasta el paso iii) se inmoviliza apretando las dos tapas contra el marco hasta que la cavidad que se forma entre ellos quede sellada excepto en su parte superior y por detrás del peine de dientes largos,
- 15 v) el gel fundido a una temperatura entre 65 y 70°C se vierte por detrás del peine de dientes largos hasta llenar la cavidad formada entre las dos tapas y el marco,
- 16 vi) la tapa 2 o tapa que encaja en la parte trasera del peine se coloca sobre el marco, por detrás del peine de dientes largos, introduciendo el reborde saliente en el escalón del peine de dientes largos, con lo que se evacua el gel fundido sobrante, dejándose el sistema en reposo hasta que dicho gel solidifique,
- 20 vii) se retira el peine de dientes largos con lo cual quedan impresos los pocillos del ancho y espesor deseados,
- 21 viii) se colocan los bloques de muestras sobre la rebaja en forma de cuña de la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine y se hacen resbalar hacia los pocillos, empujándolos con un aplicador cualquiera,
- 25 ix) una vez colocados dentro de los pocillos del gel, dichos bloques de muestras se empujan hacia el fondo de dichos pocillos con la ayuda del peine de dientes cortos, lo cual se hace encajando sus patas en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, lo que garantiza que los bloques de muestras se introduzcan hasta el fondo de los pocillos.

26.- Método de empleo según la reivindicación No. 25 caracterizado porque para llevar a cabo el proceso de electroforesis, una vez preparado el gel de caras planas con las dimensiones deseadas, es necesario realizar los siguientes pasos:

- i) se conecta la cámara a los dispositivos de alternar los campos eléctricos y energizar los electrodos,
- ii) se llena la cámara con solución tampón TBE (TBE 1x: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,4),
- 5 iii) se conecta la cámara al intercambiador externo de calor,
- iv) se verifica que el sistema limitador de turbulencias esté correctamente ubicado y se recircula la solución tampón hasta que se alcance la temperatura deseada en la cámara,
- 10 v) se detiene temporalmente la recirculación, para la colocación del gel restaurándose posteriormente la recirculación del tampón,
- vi) se calcula el tiempo de electroforesis,
- vii) se energiza el sistema y se realiza la electroforesis de las moléculas de ADN sobre el gel de caras planas, llevando a cabo la recirculación de la solución tampón a alto flujo.

15

27.- Método de empleo según las reivindicaciones No. 23 y 26 caracterizado porque al ser llenadas las cámaras con solución tampón para realizar la electroforesis, si las cámaras son de tipo CHEF necesitan que la altura del tampón sea al menos 0,3 cm mayor que el grosor del gel, lo que se logra con volúmenes que dependen de la separación 'd' entre los electrodos de polaridades opuestas según la fórmula $\{[2 + (d / \cos(30^\circ))]\} \cdot [6 + d]\} \cdot (0,3 + \text{grosor del gel})$, estando esos valores comprendidos entre 72,3 y 323,3 mL de solución tampón para geles de 0,35 y 0,5 cm de grosor respectivamente.

20

- 25 28.- Método de empleo según las reivindicaciones No. 23 y 26 caracterizado porque después de que a las camaras se le añade el tampón y el mismo se equilibra a una temperatura constante que puede estar en el rango de 4 a 30 °C, en las cámaras CHEF y TAFE se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 16 y 25 V/cm respectivamente, empleando fuentes de poder cuya salida de potencia máxima puede ser menor de 300
- 30 watts.

29.- Método de empleo según las reivindicaciones No. 23 y 26 caracterizado porque conociendo la migración por pulso 'm' de una molécula lineal de ADN en los equipos CHEF, el tiempo de electroforesis se calcula según la fórmula $[(D/m) \cdot 2 \cdot t_p]$, a partir de suministrarle el valor de la distancia 'D' en centímetros que se desea que la molécula más pequeña migre en el gel, donde el valor preferente de 'D' es la distancia entre el origen de migración y el borde inferior del gel menos 0,1 ó 0,2 cm, tamaño de gel que se calcula a partir de la distancia 'd' entre electrodos de polaridad opuesta y donde los tiempos de electroforesis empleados para separar moléculas de ADN de hasta 2 Mb en agarosa al 1.5 % y con tampón TBE 0.5 X a 30°C están comprendidos entre 1,5 horas y 9 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente, mientras que si el tampón se utiliza a 10°C ellos están entre 2,5 y 14,5 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente.

31.- Método de empleo según la reivindicación No. 24 caracterizado porque para tensar los electrodos en las cámaras de tipo TAFE es necesario llevar a cabo los siguientes pasos:

- i) aflojar el prisionero que inmoviliza al vástago en el cual está insertado el electrodo,
- ii) hacer girar el vástago el ángulo requerido para que queden tensos dichos electrodos,
- iii) apretar el prisionero para inmovilizar al vástago en su posición actual y mantener tenso el electrodo.

CÁMARA DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

RESUMEN

5

La presente invención se relaciona con el campo de la Biología Molecular y en particular se refiere a mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas 'Contour Clamped Homogeneous Electric Field' o 'Transversal Alternating Field Electrophoresis' (TAFE) y su método de empleo.

10

Las cámaras de la presente invención se emplean para la separación de grandes moléculas de ADN mediante electroforesis de campos pulsantes (ECP) en mini-equipos y geles. Las mini-cámaras de esta invención poseen un sistema para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón, para preparar geles planos, para preparar los bloques que contienen las muestras y para alinear las muestras. Estos sistemas garantizan que el área de sección transversal al paso de la corriente, tanto por el gel, como por la solución tampón donde se sumerge el gel, sea constante en toda la cámara de electroforesis e impida modificaciones regionales de la corriente que fluye en la misma, de aquí que la migración de las moléculas de ADN de cualquier talla no se modifica incontroladamente durante el proceso de electroforesis.

15

20

Las cámaras además poseen un sistema para fijar y mantener tensos los electrodos. De esta forma se simplifica su operación y se contribuye a la reproducibilidad de los patrones de bandas.

25

Con estas cámaras se obtienen separaciones reproducibles de moléculas de hasta 2 Mb en menos de 5 horas y de hasta 1 Mb en menos de 2.5 horas cuando se emplean campos eléctricos entre 8-16 V/cm, 20°C, así como la duración adecuada de los pulsos eléctricos y una correcta polarización de los electrodos.

En la invención se brinda además un método para seleccionar las condiciones de electroforesis empleando dichas cámaras.

5

AUTORES

	Ana María Riverón Rojas	29 %
10	Lilia López Cánovas	21 %
	Oscar Arencibia Díaz	20 %
	José A Herrera Isidró	9 %
	Esther Orozco Orozco	8 %
	Gabriel Pérez Pérez	5 %
15	Carlos Canino Ramos	2 %
	Luis M. Batista Santiler	2 %
	Regnar Gigato Pérez	2 %
	María Dolores Noa Blanco	1 %
	Elisa Javert Higginson	1 %

20

Fig. 1.

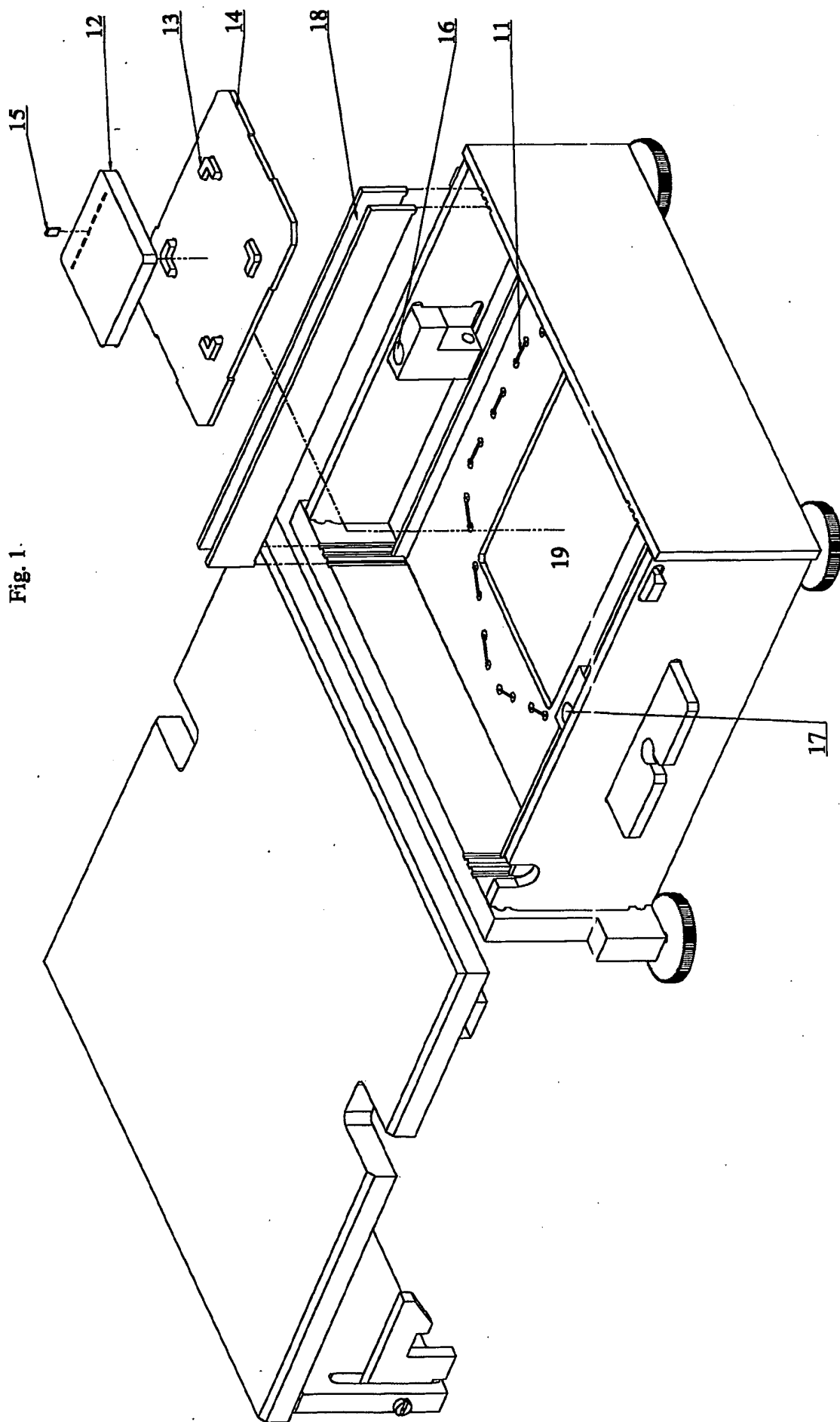


Fig. 2

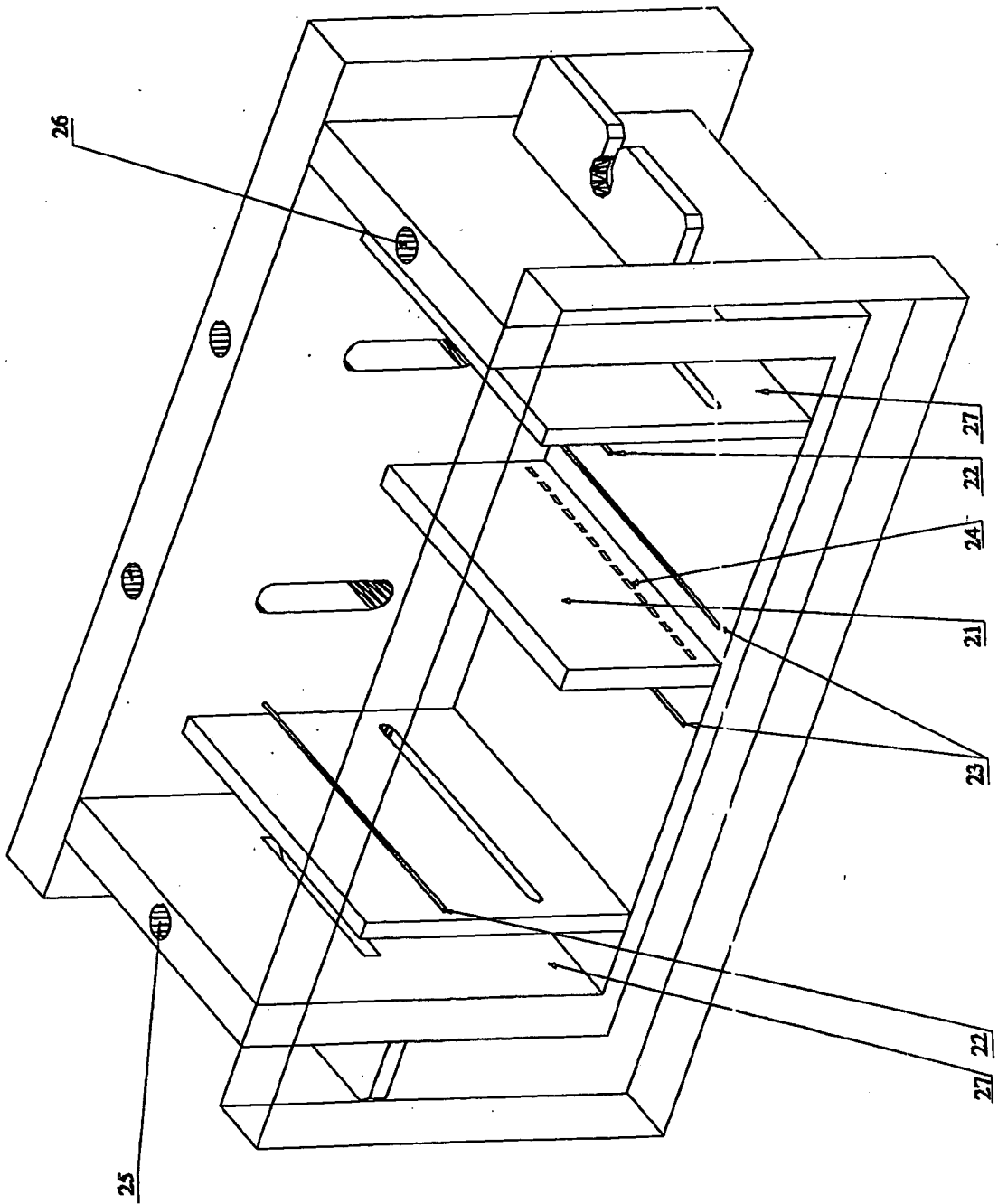


Fig. 3

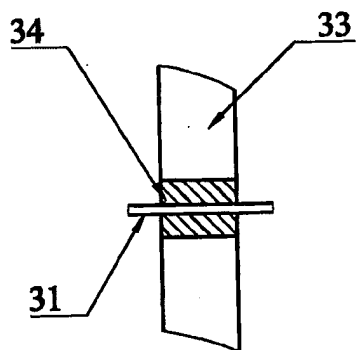
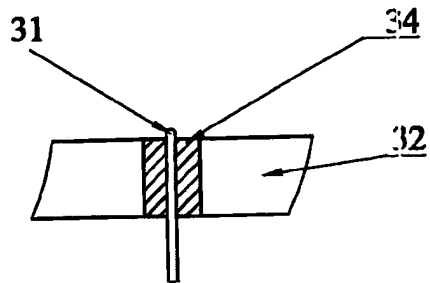


Fig. 4

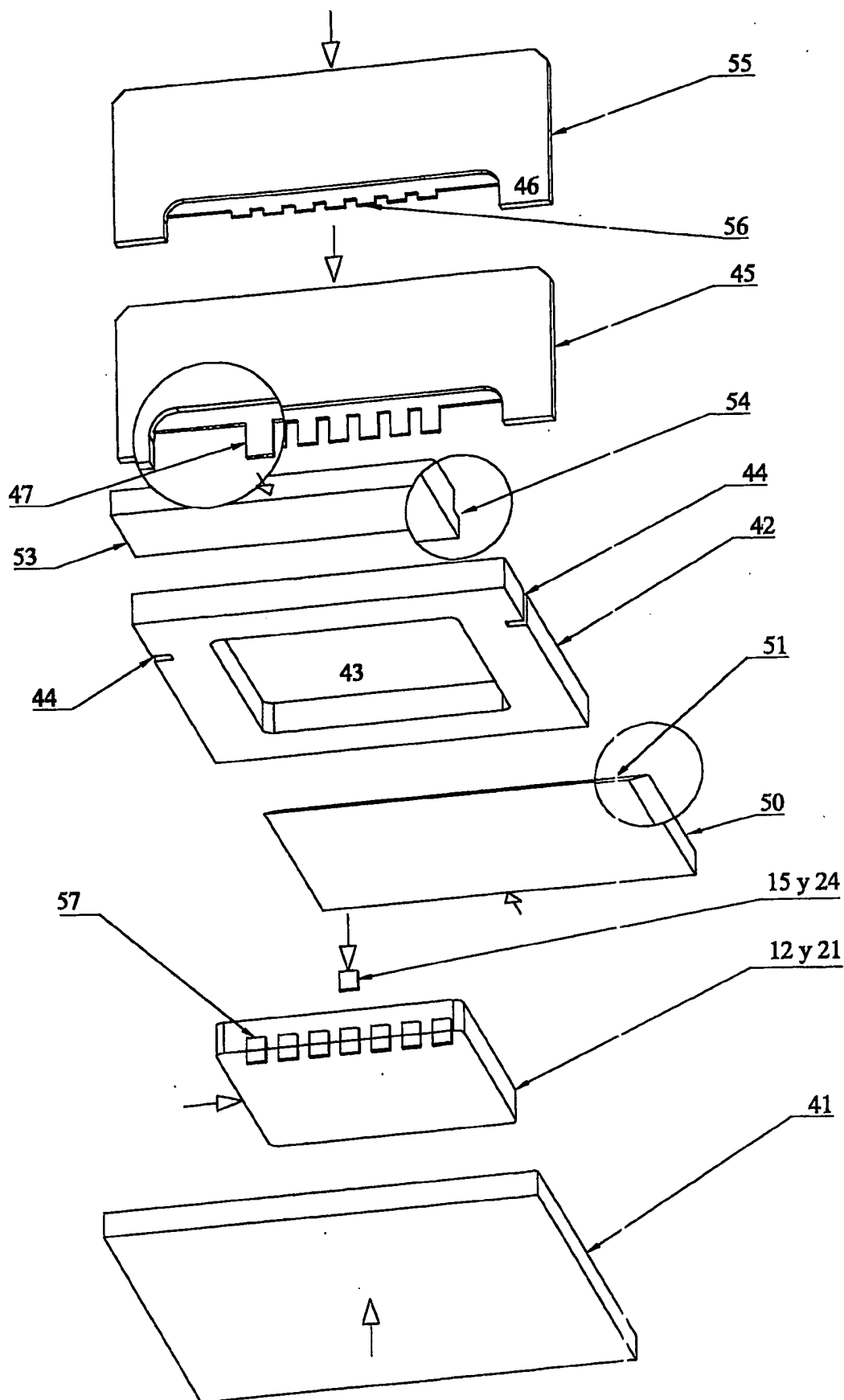
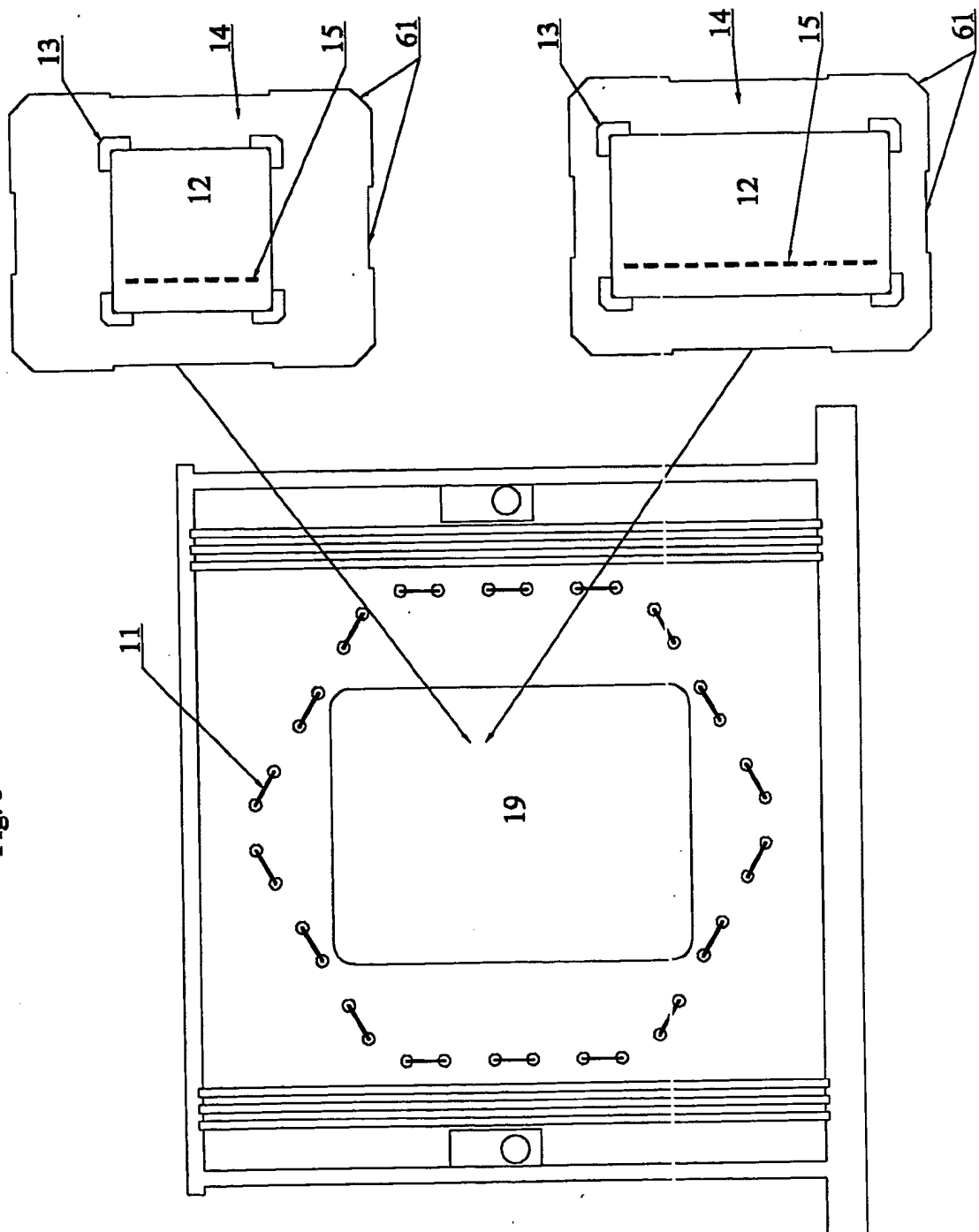


Fig. 5



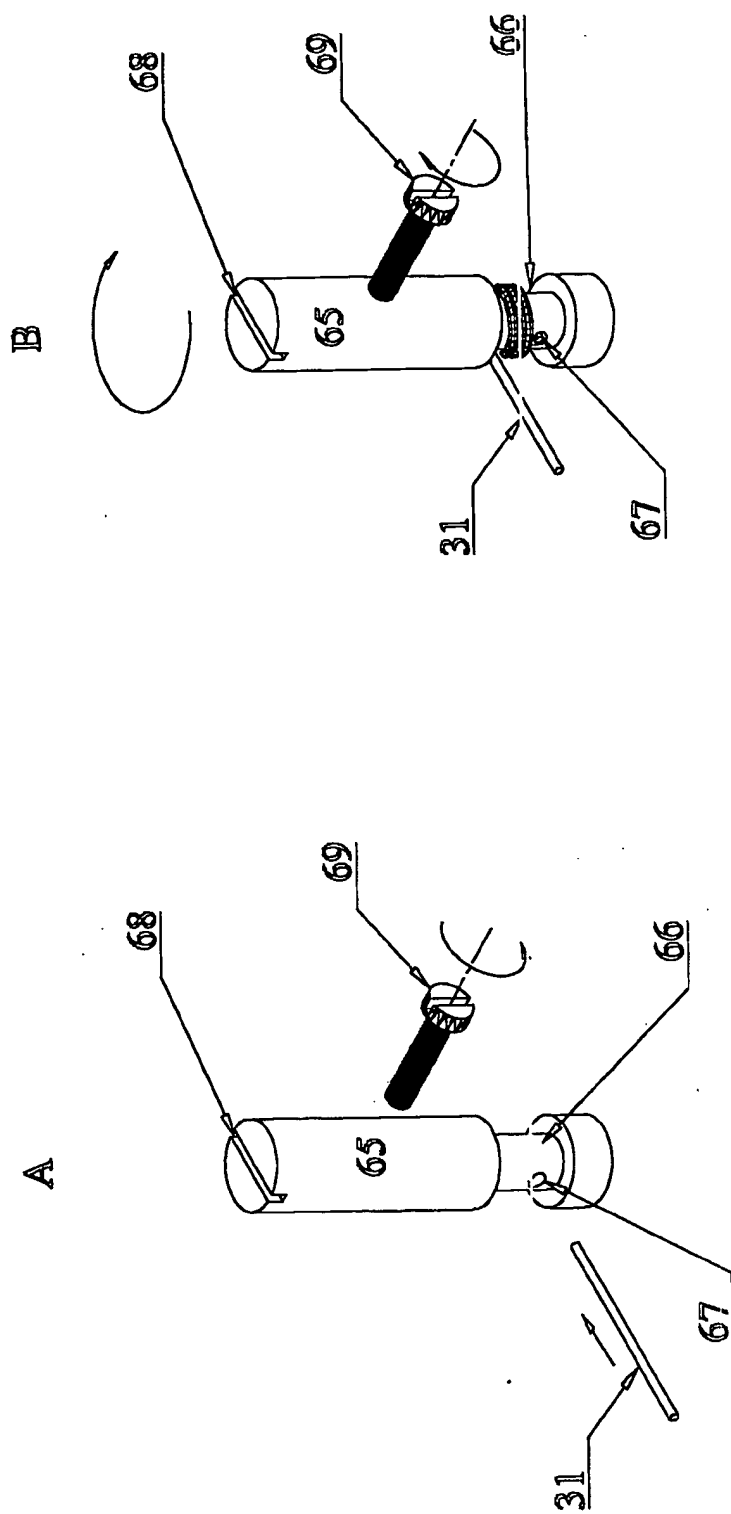


Fig. 6

Fig. 7

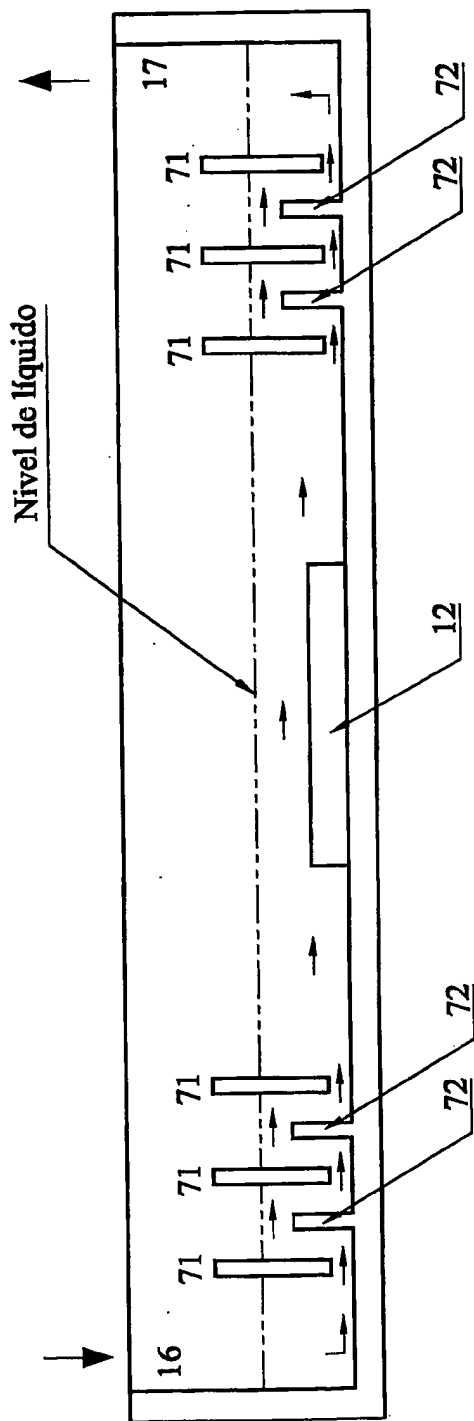


Fig. 8

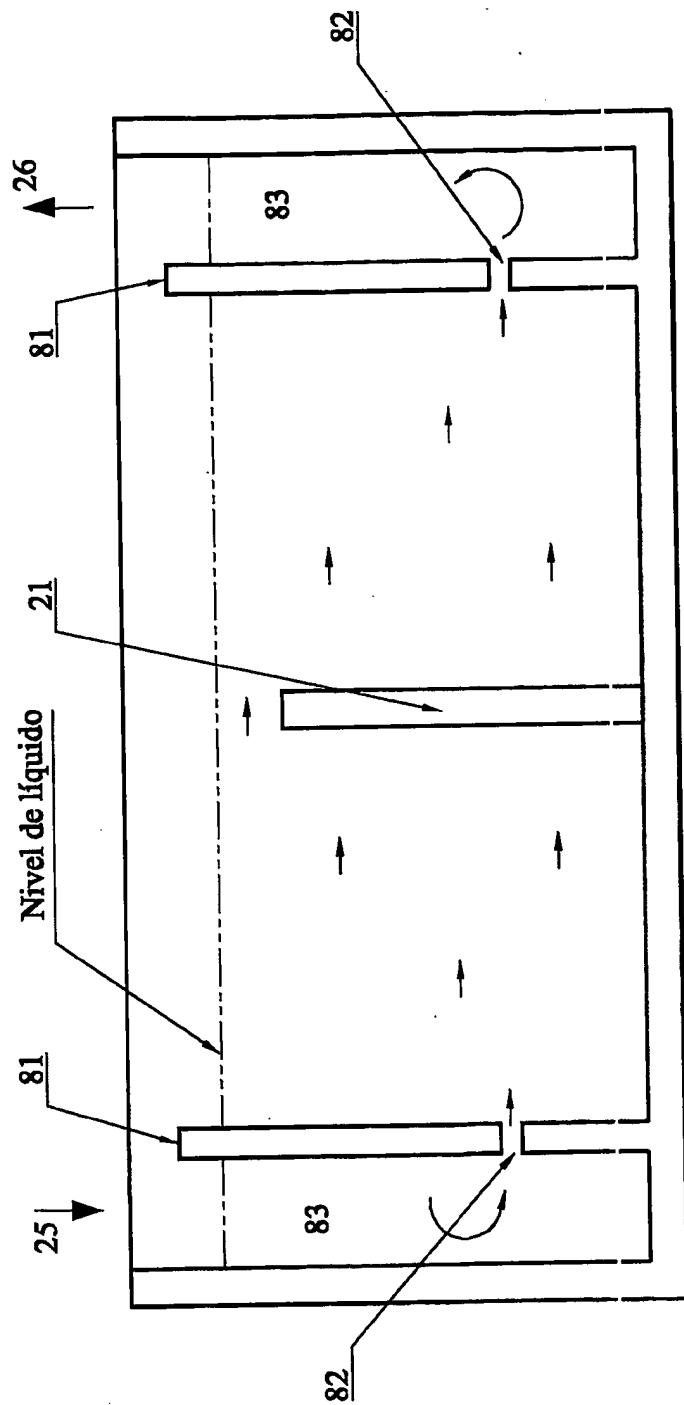


Fig. 9

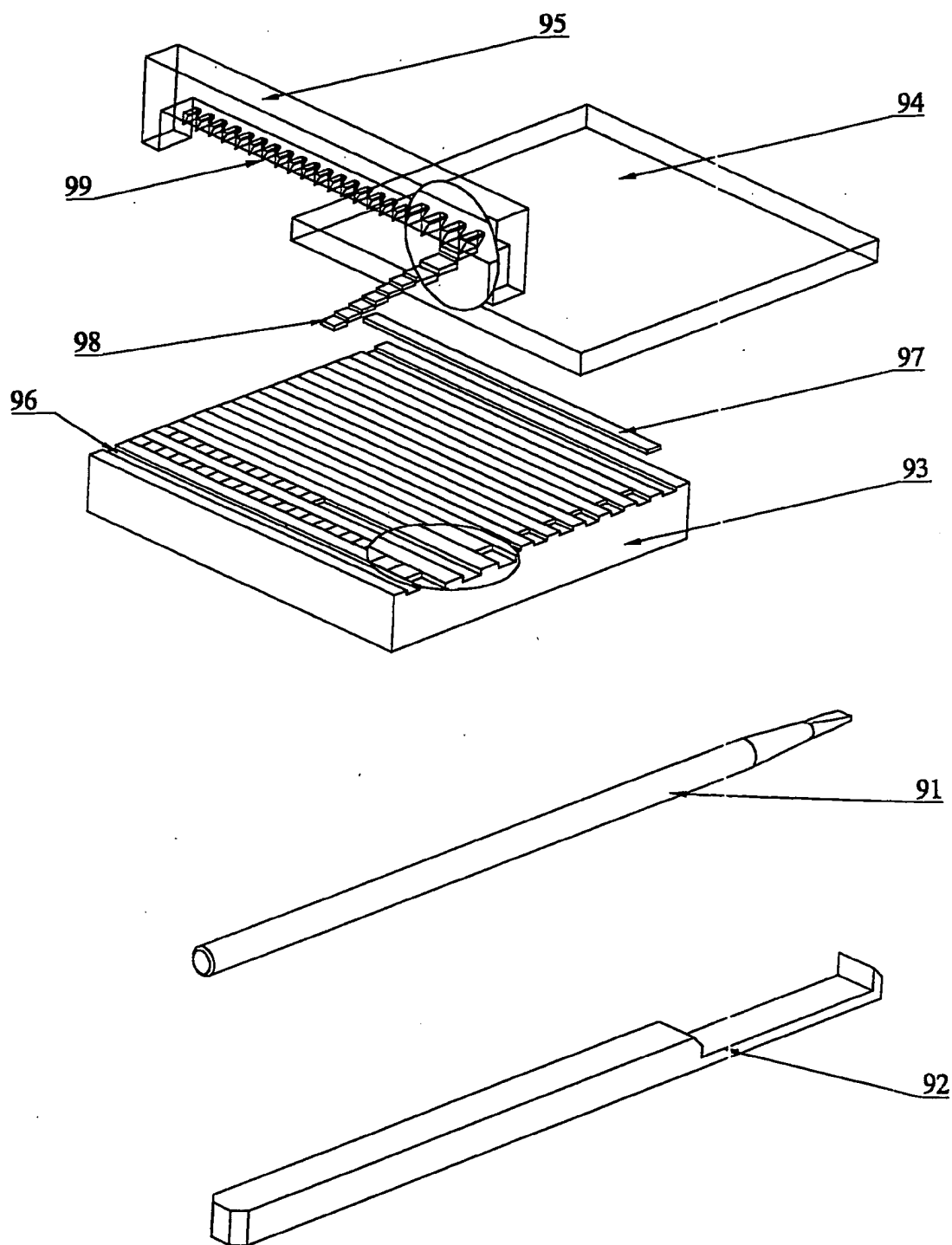


Fig. 10

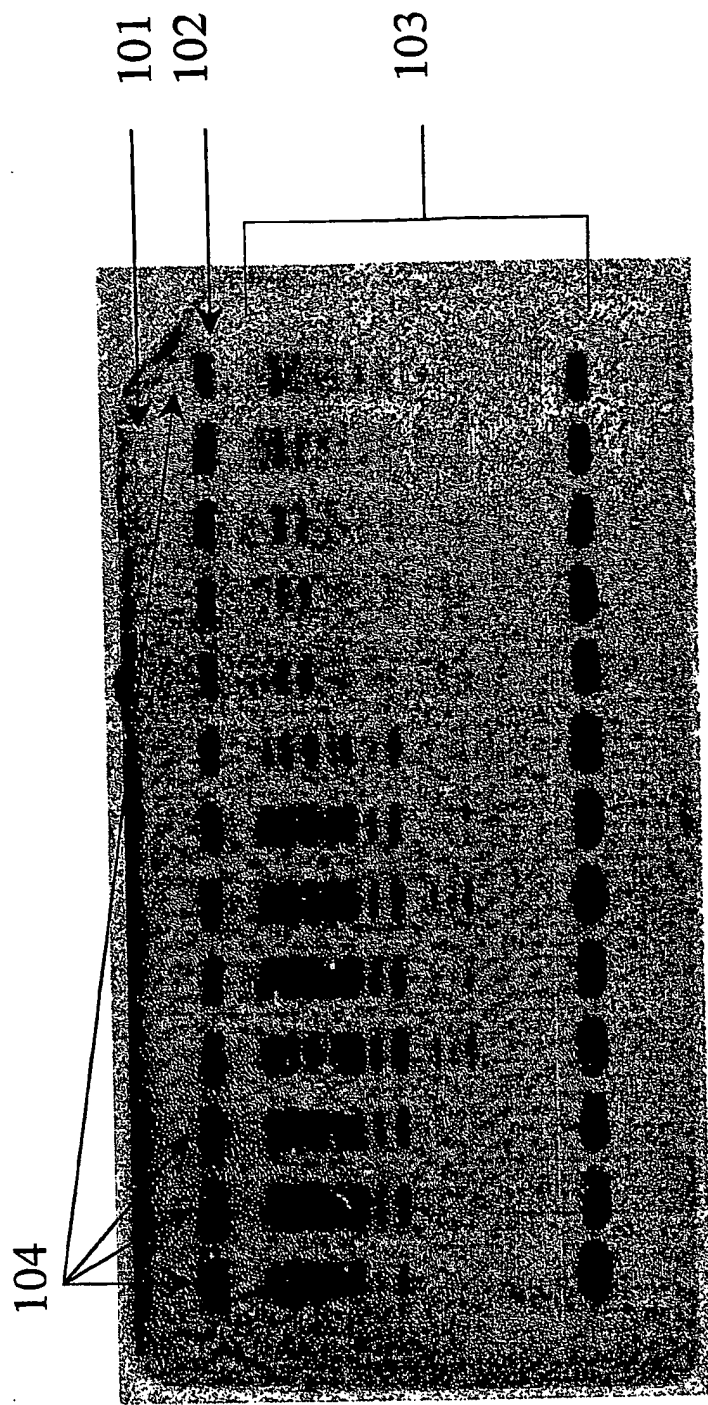


Fig. 11

